
**Charakterisierung von
Scp160p,
einem mRNA- und ribosomen-
assoziierten Protein
in *Saccharomyces cerevisiae***

**Steffen Frey
2002**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER
NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN
GESAMTFAKULTÄT
DER
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT
HEIDELBERG

VORGELEGT VON
DIPLOM-BIOCHEMIKER STEFFEN FREY
AUS HEILBRONN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 11. DEZEMBER 2002

Thema

**Charakterisierung von Scp160p,
einem mRNA- und ribosomen-
assoziierten Protein
in *Saccharomyces cerevisiae***

Gutachter

Prof. Dr. Bernhard Dobberstein
Prof. Dr. Eduard Hurt

Mein besonderer Dank für die Vergabe des Themas und die wissenschaftliche Betreuung gilt Dr. **Matthias Seedorf**. Er hatte nahezu immer Zeit und ein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen.

Bei Prof. Dr. **Bernhard Dobberstein** bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien, für wissenschaftliche Ratschläge sowie die Begutachtung meiner Arbeit.

Prof. Dr. **Eduard Hurt** danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit zu bewerten und sie als Zweitgutachter vor der Fakultät zu vertreten.

Prof. Dr. **Thomas Preiss** (Sydney, Australien) möchte ich für die Durchführung der Transkriptom-Analysen auf Mikroarrays danken.

Ute Bach und **Gerry Meese** möchte ich für die Erledigung eines Großteils der lästigen Organisationsarbeit im Hintergrund danken.

Dr. **Martin Pool** danke ich für seine präzisen, pointierten und qualifizierten Ratschläge in fachlichen und sprachlichen Belangen.

Ein großes Dankeschön an **Christoph Jüschke**! Ohne ihn wäre so mancher Labortag schwerer und weniger unterhaltsam vergangen.

Allen nicht namentlich genannten **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** danke ich für große und kleine Hilfen, für wertvollen Kritiken und Ratschläge und für die Vermittlung einer guten Arbeitsatmosphäre.

Für ihr Verständnis dafür, dass sich die Pflichten eines Doktoranden nicht immer mit denen eines Ehemannes und Familienvaters vereinbaren lassen, danke ich meiner Frau **Catarina** und meinem Sohn **Linus**. Sie haben mir oft als persönliches Kompetenzteam bei der Bewältigung so mancher Rückschläge beigestanden.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zytoplasmatische Aspekte der posttranskriptionalen Genregulation	2
1.1.1	Lokalisation von mRNA	2
1.1.2	Translationsregulation	3
1.1.3	Kopplung von mRNA-Lokalisation und Translation	5
1.1.4	Regulation der zytoplasmatischen mRNA-Stabilität	6
1.2	Die KH-Domäne	6
1.3	Die Vigilin-Proteinfamilie	8
1.3.1	Vigilin in Vertebraten	8
1.3.2	DDP1 in <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.3.3	Scp160p in Hefe	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien	12
2.1.2	Enzyme	12
2.1.3	Antikörper	12
2.1.4	Größen-Standards	12
2.1.5	Oligonukleotide	12
2.1.6	Plasmide	15
2.1.7	Organismen	17
2.1.8	Medien	18
2.1.9	Stammlösungen	18
2.1.10	Kits	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.2	Hefe-spezifische Methoden	22
2.2.3	RNA-spezifische Methoden	24
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.5	Auswertung von Mikroarray-Experimenten	28
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Scp160p	31
3.1.1	Lokalisation von Scp160p	31
3.1.2	Charakterisierung von Scp160p in einer zytosolischen und einer membranangereicherten Fraktion	32
3.1.3	Beitrag des Zytoskeletts zur Lokalisation von Scp160p	41
3.2	Analyse der Domänenstruktur von Scp160p	44
3.2.1	Auswirkungen einer Deletion von Scp160p-Fragmenten auf den zellulären DNA-Gehalt und die Polysomen-Assoziation von Scp160p	44
3.2.2	Identifizierung und Charakterisierung eines Kernimport-Signals in Scp160p	47
3.3	Einfluss von Scp160p auf den mRNA-Metabolismus	57
3.3.1	Expression von Scp160p unter Kontrolle eines hybriden <i>GAL1/SCP160</i> -Promotors	57
3.3.2	Einfluss von Scp160p auf das Transkriptom	58
3.3.3	Einfluss von Scp160p auf mRNAs in einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion	62

4	DISKUSSION	73
4.1	Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Scp160p	73
4.1.1	Scp160p ist am ER angereichert	73
4.1.2	Scp160p bindet mRNA-abhängig an zytosolische und membrangebundene Polysomen	73
4.1.3	Scp160p bindet an eine Subfraktion von Ribosomen	74
4.1.4	Die Anreicherung von Scp160p an der ER-Membran setzt ein funktionelles Tubulin-Zytoskelett voraus.	75
4.2	Analyse der Funktion einzelner Domänen und Sequenzen in Scp160p	78
4.2.1	Die AS 98-142 von Scp160p enthalten ein Kernimport-Signal	78
4.2.2	Verlust von Scp160p führt zu einer koordinierten DNA-Verdopplung	79
4.2.3	Die Unterdrückung der DNA-Verdopplung ist unabhängig von einer Polysomenassoziation von Scp160p	80
4.3	Einfluss einer Scp160p-Depletion auf den zellulären mRNA-Metabolismus	81
4.3.1	Einfluss von Scp160p auf das Transkriptom	81
4.3.2	Einfluss von Scp160p auf mRNAs in einer membrangebundenen und einer zytosolischen Fraktion	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	90
7	LITERATUR	93
7.1	veröffentlichte Teile dieser Arbeit	93
7.2	zitierte Literatur	93

1 EINLEITUNG

Boten-RNA (mRNA) stellt die universelle Verbindung zwischen der in der DNA gespeicherten Erbinformation und einer durch Proteine vermittelten Genfunktion dar. Die mRNA ist jedoch mehr als eine für den Informationsfluss notwendige Zwischenstufe: Neben ihrer Synthese (Transkription) finden sich im Lebenszyklus einer mRNA mit Prozessierung, Kernexport sowie zytoplasmatischem Transport, Verankerung, Translation, Stabilisierung und Abbau wichtige regulierte Schritte, die zu einer Anpassung der Menge und Lokalisation einzelner Proteine an die Bedürfnisse der Zelle beitragen (Abb. 1.1). Diese Schritte werden unter dem Überbegriff *posttranskriptionale Genregulation* zusammengefasst. Die experimentelle Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung von Scp160p, einem Hefe-Protein, dass aufgrund seiner Charakteristika und Lokalisation an zytoplasmatischen Vorgängen der posttranskriptionalen Genregulation beteiligt sein könnte. In den folgenden Abschnitten sollen daher anhand von Beispielen die Prinzipien wichtiger zytoplasmatischer Aspekte der posttranskriptionalen Genregulation erläutert werden.

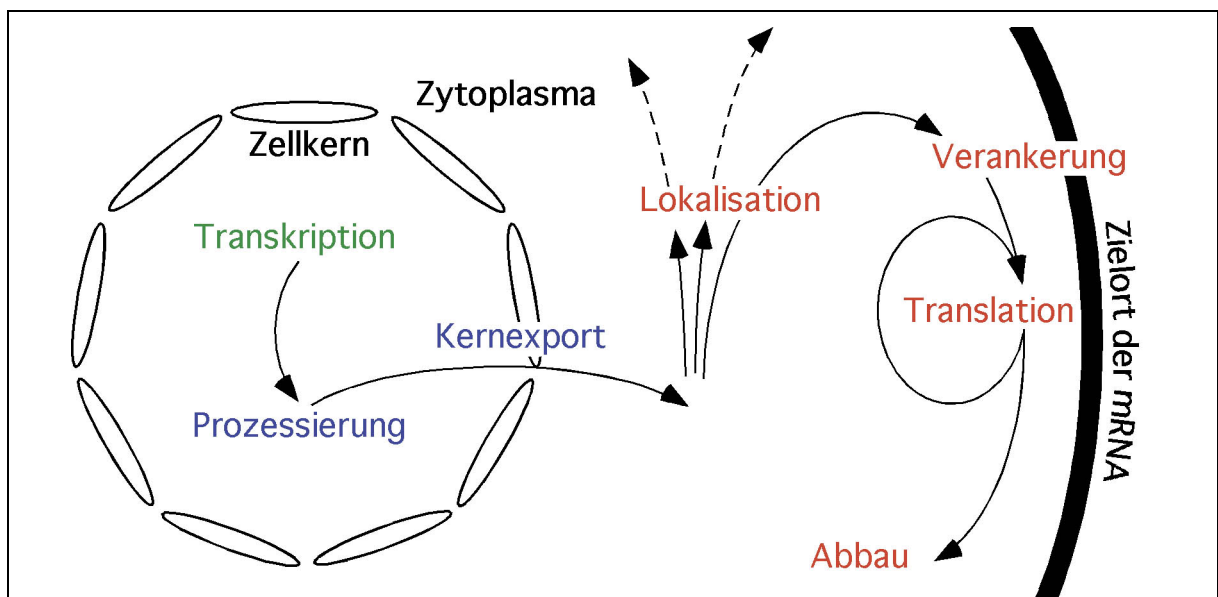


Abb. 1.1 Aspekte der posttranskriptionalen Genregulation

Schematische Darstellung möglicher Stufen der posttranskriptionalen Genregulation.

Nukleäre Aspekte sind in blauer, zytoplasmatische in roter Schrift dargestellt.

Nach seiner Synthese (Transkription) wird ein Transkript durch Anfügen der CAP-Struktur, Splicen und Polyadenylierung prozessiert. Die reife mRNA wird aus dem Zellkern exportiert. Im Zytoplasma können mRNAs durch einen Lokalisationsprozess an einem definierten Zielort angereichert und verankert werden. Im allgemeinen werden lokalisierte mRNAs erst nach erfolgter Lokalisation translatiert. Die Translation kann am Zielort re-initiiert werden. Der Lebenszyklus der mRNA wird durch ihren Abbau abgeschlossen. Eine detailliertere Erklärung der zytoplasmatischen Aspekte findet sich im Text.

1.1 Zytoplasmatische Aspekte der posttranskriptionalen Genregulation

1.1.1 Lokalisation von mRNA

Die Lokalisation von mRNAs ist ein Prozess, in dem eine mRNA nach ihrer Synthese an einem definierten Ort angereichert wird. Als **Zielorte** einer mRNA-Lokalisation kommen je nach individueller mRNA Tochterzellen, Pole von Oozyten sowie membranumschlossene Organellen oder makromolekulare Strukturen innerhalb einer Zelle in Frage.

Ein Beispiel für eine mRNA-Lokalisation zur **Tochterzelle** stellt die *ASH1* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* dar. Die Lokalisation der mRNA ist die Ursache für eine asymmetrische Verteilung des Transkriptionsfaktors Ash1p, der in der Folge in der Tochterzelle einen Wechsel des Paarungstyps unterdrückt (Long *et al.*, 1997). Eine mRNA-Lokalisation innerhalb von **Oozyten** ist bei der Entwicklung von *Drosophila* und *Xenopus* von großer Bedeutung. Beispielsweise ist in der *Drosophila*-Oozyte eine Lokalisation der *bicoid*, *nanos* und *oskar* mRNAs an den Polen der Oozyte zur korrekten Steuerung von Differenzierungsvorgängen nötig. Die mRNA-Lokalisation bewirkt die Ausbildung einer charakteristischen Verteilung der kodierten Proteine (Morphogen-Gradienten), die nach der Zellularisierung zur Differenzierung morphologisch unterschiedlicher Zellen und Gewebe führt (Driever & Nüsslein-Volhard, 1988; Ephrussi & Lehmann, 1992; Gavis & Lehmann, 1992; Smith *et al.*, 1992).

Die intrazelluläre Lokalisation einer mRNA an **membranumgebenen Organellen** – etwa nahe dem Zellkern, an Mitochondrien oder an einer Subdomäne des ER – kann die effiziente Lokalisation der kodierten Proteine unterstützen (Corral-Debrinski *et al.*, 2000; Levadoux *et al.*, 1999). So bewirkt in Reissamen die Lokalisation von mRNAs die Synthese der kodierten Speicherproteine an den Prolamin-Körperchen, die eine spezialisierte Subdomäne des ER darstellen (Choi *et al.*, 2000; Muench *et al.*, 2000; Muench *et al.*, 1998). Daneben gibt es Hinweise darauf, dass die Lokalisation spezifischer mRNA auch bei der Verteilung von Membranproteinen in spezifische Subdomänen der Plasmamembran beteiligt sein kann (Takizawa *et al.*, 2000).

Neben den genannten Beispielen kann eine mRNA-Lokalisation auch zum Aufbau komplexer **Multiprotein-Strukturen** beitragen. So benötigt die geordnete Biogenese von Flagellen in *Naegleria gruberi* die gemeinsame Lokalisation mehrerer mRNAs am Ort der Flagellen-Synthese (Han *et al.*, 1997). Des weiteren sind einige Proteine des Zytoskeletts in der Lage, bereits während ihrer Synthese Komplexe zu bilden. Durch die gleiche Lokalisation der kodierenden mRNAs wird diese Komplexbildung erleichtert (Isaacs *et al.*, 1989; L'Ecuyer *et al.*, 1998).

In der Literatur existieren zwei prinzipiell unterschiedliche, sich jedoch gegenseitig nicht ausschließende **Mechanismen**, die zu einer definierten Lokalisation von mRNAs in der Zelle führen können: Aktiver Transport sowie selektive Stabilisierung der mRNA am Zielort (Bashirullah *et al.*, 1998; Lipshitz & Smibert, 2000).

Ein **aktiver Transport** entlang dem Zytoskelett führt in *Drosophila* zur Lokalisation der *oskar* und *bicoid* mRNAs (Lipshitz & Smibert, 2000). Beide mRNAs werden in den Ammenzellen in der Mitte der Eizellreifung synthetisiert und in den vorderen Teil der Oozyte transportiert. Während die *bicoid* mRNA im vorderen Pol der Oozyte verankert wird, wird die *oskar* mRNA zum hinteren Pol transportiert und dort verankert. In Hefe wird die *ASH1* mRNA entlang des Aktin-Zytoskeletts von der Mutterzelle an die Spitze der Tochterzelle transportiert und dort verankert (Long *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1997). Die zweite Möglichkeit zur Lokalisation von mRNAs, **selektive Stabilisierung** einer mRNA in einer definierten Region der Zelle in Kombination mit einem Abbau im übrigen Zytoplasma, spielt in *Drosophila* für die Lokalisation der *Hsp83* und *nanos* mRNAs eine wichtige Rolle (Bashirullah *et al.*, 1999; Bergsten & Gavis, 1999; Ding *et al.*, 1993). Die Regulation der selektiven mRNA-Stabilisierung erfordert sowohl destabilisierende Sequenzen innerhalb der mRNA als auch Bereiche, die die mRNA am Zielort vor Abbau schützen. In beiden genannten Fällen befinden sich diese regulatorischen Sequenzen im 3'-UTR der mRNAs (Bashirullah *et al.*, 1999).

1.1.2 Translationsregulation

Eine eukaryontische Zelle hat die Möglichkeit, die *generelle* Proteinsynthese als Antwort auf verschiedene Stimuli zu regulieren. Häufig geschieht dies durch Regulation des Phosphorylierungszustands von Translations-Initiations- und Elongationsfaktoren (Hershey, 1990). Beispielsweise führt Aminosäureentzug zu einer Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2A und dadurch zur generellen Hemmung der Proteinsynthese (Kimball, 2001; 2002). Daneben wird die *spezifische* Translationsaktivität vieler mRNAs durch Sequenzelemente innerhalb der mRNA bestimmt. Durch ihre Interaktion mit regulatorischen Faktoren vermitteln diese Sequenzen eine Steuerung unterschiedlicher Schritte der Translation.

Einer der bestimmenden Parameter für die Effizienz der Translation und Stabilität einer mRNA ist die **Länge des Poly(A)-Schwanzes** am 3'-Ende einer RNA. Eine Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes führt zu einer translationalen Aktivierung und Stabilisierung der mRNA, eine Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes führt dagegen zu einer Translationshemmung und schließlich zum mRNA-Abbau. Der Einfluss des Poly(A)-Schwanzes auf die Translationsrate wird durch ein Modell erklärt, demzufolge translatierte mRNA-Moleküle eine ringförmige Konformation annehmen (Jacobson, 1996; Sachs, 2000). Die Verbindung der 3'- und 5'-Enden der mRNA wird durch eine Interaktion von eIF4G, einer Komponente des CAP-bindenden Komplexes eIF4F, mit dem Poly(A)-bindenden Protein (PABP) vermittelt (Tarun &

Sachs, 1996). Die Länge des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA bestimmt die Anzahl der gebundenen PABP-Moleküle und damit die Effizienz des Ringschlusses. Einer Hypothese zufolge erleichtert ein Ringschluss die Reinitiation der Translation, indem dieser die mRNA-Enden, an denen Termination und Initiation stattfinden, in engen Kontakt bringt. Gleichzeitig trägt ein Ringschluss zum Schutz beider mRNA-Enden vor Abbau bei (Johnstone & Lasko, 2001; Sachs, 2000). Eukaryontische Zellen sind in der Lage, durch eine Veränderung der Länge des Poly(A)-Schwanzes die Translationsrate definierter mRNAs zu regulieren. Eine solche Translationskontrolle durch Regulation der Länge des Poly(A)-Schwanzes spielt während der Entwicklung in Vertebraten und Invertebraten eine bedeutende Rolle (de Moor & Richter, 1999; 2001; Richter, 1999; 2000). Eine zytoplasmatische Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes kann durch zytoplasmatische Polyadenylierungs-Elemente (CPEs), die häufig im 3'-UTR der mRNA liegen, vermittelt werden (Richter, 1999). In *Drosophila* ist dieser Vorgang für die translationale Aktivierung von Schlüsseldeterminanten der embryonalen Musterbildung wie *bicoid*, *torso* oder *Toll* mRNAs verantwortlich (Salles *et al.*, 1994). Ähnlich wie die zytoplasmatische Polyadenylierung wird eine Deadenylierung von mRNAs häufig durch Deadenylierungs-Elemente (EDEN) innerhalb der mRNAs reguliert (Audic *et al.*, 1997; Bouvet *et al.*, 1994; Legagneux *et al.*, 1992; Legagneux *et al.*, 1995; Paillard *et al.*, 1998). Ein Beispiel für eine mRNA, die durch Deadenylierung translational reprimiert wird, stellt die *hunchback* (*hb*) mRNA in *Drosophila* dar (Wharton & Struhl, 1991; Wreden *et al.*, 1997).

Neben der Regulation der Länge des Poly(A)-Schwanzes kann die Translation einer mRNA auch durch ihre **Maskierung** reguliert werden. Bei diesem Vorgang werden mRNAs in einen mRNP-Partikel derart eingebunden, dass sie für Translation oder Abbau unzugänglich sind (Spirin, 1996). Es wird angenommen, dass die Maskierung durch Proteine bewirkt wird, die eine RNA binden und ihre Konformation verändern. Nach entsprechendem Stimulus werden die maskierenden Proteine entfernt und damit eine Translation der mRNA ermöglicht (Johnstone & Lasko, 2001). Ein derartiger Vorgang ist unter anderem an der Translationskontrolle der *cyclin B1* mRNA in *Xenopus*-Oozyten beteiligt (Barkoff *et al.*, 2000; de Moor & Richter, 1999).

Ein wichtiges Beispiel für translationale Kontrolle durch **Sekundärstrukturelemente** in den nichttranslatierten Bereichen der mRNAs finden sich im zellulären Eisen-Metabolismus bei der Regulation des Eisen-Speicherproteins Ferritin und des für die Eisen-Aufnahme essentiellen Transferrin-Rezeptors (TfR). Die Eisen-Aufnahme und -Speicherung wird durch einen Rückkopplungs-Mechanismus reguliert, der auf einer posttranskriptionalen Ebene durch die zytoplasmatischen Faktoren IRP1 und IRP2 (*iron responsive protein 1/2*) vermittelt wird (Hentze & Kuhn, 1996; Ponka *et al.*, 1998). Diese Proteine binden bei geringer Eisen-Konzentration an Sekundärstrukturen im 5'-UTR der *Ferritin* mRNA und im 3'-UTR der *TfR* mRNA. Diese

Bindung inhibiert die Translation der *Ferritin* mRNA und stabilisiert gleichzeitig die *TfR* mRNA (Dix *et al.*, 1993; Gray & Hentze, 1994).

Während der Translations-Initiation ist auch die **Einbindung der 60S-ribosomalen Untereinheit** ein regulierter Schritt (Ostareck *et al.*, 2001). In Erythrozyten-Vorläuferzellen aus Säugern reprimiert ein spezifischer mRNP-Komplex die Translation der 15-Lipoxygenase (LOX) mRNA durch eine Interaktion mit ihrem 3'UTR (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Diese Translationshemmung findet auf Ebene der Einbindung der 60S-ribosomalen Untereinheit statt (Ostareck *et al.*, 2001) und wird durch Veränderung der Aktivität der an diesem Schritt beteiligten Initiationsfaktoren eIF5 und eIF5B vermittelt (Chakravarti *et al.*, 1993; Pestova *et al.*, 2000; Raychaudhuri *et al.*, 1985a; b).

1.1.3 Kopplung von mRNA-Lokalisation und Translation

Bei vielen mRNAs sind Lokalisation und Translation mechanistisch aneinander gekoppelt: Während des Lokalisationsprozesses ist die Translation der mRNA gehemmt; erst nach korrekter Lokalisation der mRNA wird die Hemmung aufgehoben und eine Translation ermöglicht (Lipshitz & Smibert, 2000). In *Drosophila* ist ein derartiger Mechanismus während der Lokalisation der *oskar* und *nanos* mRNAs zum hinteren Ende der Oozyte von Bedeutung (Dahanukar & Wharton, 1996; Gavis & Lehmann, 1994; Gunkel *et al.*, 1998; Kim-Ha *et al.*, 1995; Smibert *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 1997). Sowohl die Regulation dieser Translationshemmung als auch die nachfolgende Aktivierung der Translation wird in diesen Beispielen durch direkt oder indirekt an die mRNA bindende Proteine vermittelt (Johnstone & Lasko, 2001). Ein weiteres – jedoch sehr viel generelleres Beispiel – stellt die SRP-vermittelte Translationshemmung während des Transports von Komplexen aus mRNA, Ribosomen und naszierenden Ketten ans ER dar. Auch hier wird die Proteinsynthese solange gehemmt, bis der Gesamtkomplex den Zielort erreicht (Walter & Blobel, 1981).

Neben der translationalen Hemmung misslokalisierter mRNAs stellt eine translationsabhängige Verankerung einen weiteren Mechanismus dar, über den mRNA-Lokalisation und Translation gekoppelt sein können. Ein Beispiel dafür ist die *ASH1* mRNA in Hefe, deren Verankerung zum Teil durch ihre Translation vermittelt wird. Die Verhinderung der Translation C-terminaler Bereiche von Ash1p führt zu einer Mislokalisation der *ASH1* mRNA (Gonzalez *et al.*, 1999).

1.1.4 Regulation der zytoplasmatischen mRNA-Stabilität

Die Veränderung von Stabilität und Abbaurate einzelner mRNAs erlaubt es einer Zelle, die Menge einer mRNA und damit die Proteinsyntheserate sehr schnell ihren Bedürfnissen anzupassen (Wilusz *et al.*, 2001). Beide Parameter werden durch stabilisierende oder destabilisierende Sequenzelemente innerhalb der mRNA reguliert (Bakheet *et al.*, 2001; Chen & Shyu, 1995; Veyrune *et al.*, 1995).

Der erste Schritt des Abbaus der meisten mRNAs ist die Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes durch eine Deadenylase. Die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes ist das Signal für die Spaltung der CAP-Struktur und einen schnellen Abbau der verbleibenden RNA durch Exonukleasen (Beelman *et al.*, 1996; Hsu & Stevens, 1993; LaGrandeur & Parker, 1998; Wilusz *et al.*, 2001). Interne RNA-Sequenzen können diesen Abbau-Mechanismus regulieren, indem sie durch spezifisch bindende Faktoren die Interaktion von PABP und dem Poly(A)-Schwanz oder zwischen eIF4E und der CAP-Struktur am 5'-Ende der mRNA verändern und dadurch die Zugänglichkeit der mRNA für abbauende Enzyme modulieren (Bernstein *et al.*, 1989).

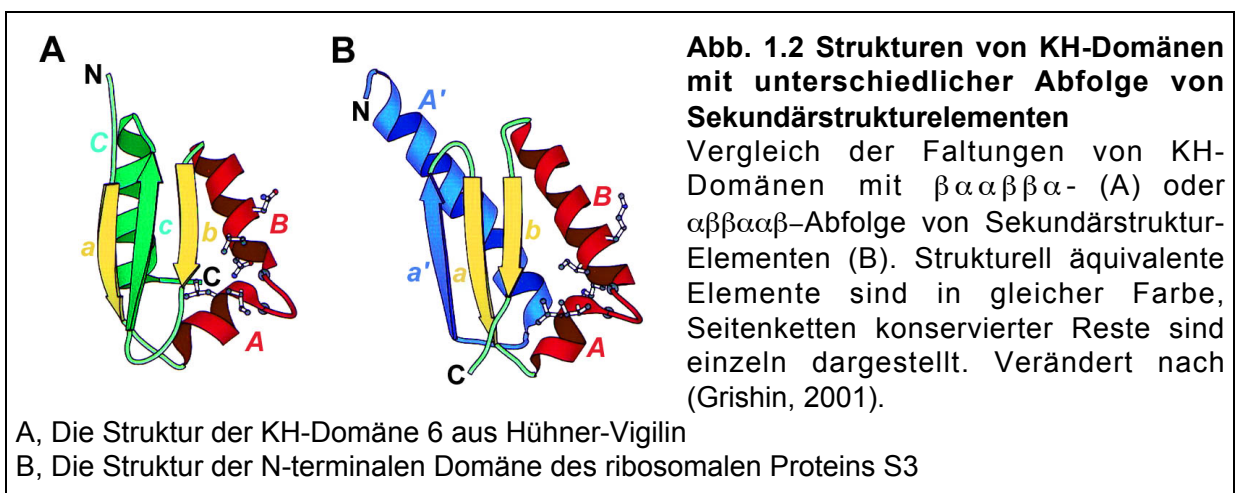
Zusätzlich beeinflusst die Translationsrate die Stabilität einer mRNA: Eine Hemmung der Translations-Initiation destabilisiert mRNAs, eine Hemmung der Translations-Elongation führt dagegen zu einer mRNA-Stabilisierung. Diese Korrelation wird auf die Interaktion von Ribosomen mit der mRNA und den dadurch erschwerten Zugang RNA-abbauender Enzyme zurückgeführt (Beelman & Parker, 1994).

1.2 Die KH-Domäne

Alle posttranskriptionalen Schritte der Genregulation werden durch RNA-bindende Proteine vermittelt. Während ihres gesamten Lebenszyklus liegen mRNA-Moleküle in dynamischen Komplexen mit unterschiedlichen RNA-bindenden Proteinen vor (Dreyfuss *et al.*, 2002). Die individuelle Ausstattung einer mRNA mit Proteinen hängt im Wesentlichen von den spezifischen, in ihrer Sequenz begründeten Eigenschaften ab. Eine Fülle unterschiedlicher Protein-Domänen sind in der Lage, eine Interaktion mit RNA zu vermitteln (Burd & Dreyfuss, 1994). Je nach Proteinumfeld können solche RNA-bindenden Domänen einzelne Sequenzen hochspezifisch erkennen oder aber eine eher unspezifische Bindung vermitteln. Häufig beinhalten RNA-bindende Proteine unterschiedliche RNA-bindende Domänen, die verschiedene Strukturelemente einer Ziel-RNA erkennen und damit zu einer spezifischen RNA-Bindung beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse ist die KH-Domäne (hnRNP K-Homologie-Domäne), die im untersuchten Protein Scp160p in 14 Kopien auftritt. Die KH-Domäne wurde zunächst in hnRNP K (Siomi *et al.*, 1993), später in vielen weiteren RNA-bindenden Proteinen entdeckt. Im Proteinkontext konnte eine sequenzspezifische RNA-Interaktionen einzelner oder mehrerer KH-Domänen nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind Nova-1 (Buckanovich & Darnell, 1997;

Jensen *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998), der Splicing Faktor SF1/BBP (Berglund *et al.*, 1998), hnRNP K und E1/E2 (Ostareck *et al.*, 1997; Thisted *et al.*, 2001) sowie *Xenopus*-Vigilin (Cunningham *et al.*, 2000; Kanamori *et al.*, 1998). Eine KH-Domäne umfasst etwa 70 Aminosäuren. Die typische Abfolge von α -Helices und β -Faltblatt-Elementen ist $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ oder $\beta\alpha\alpha\beta\alpha$. Trotz der unterschiedlichen Abfolgen der Sekundärstrukturelemente resultiert in beiden Fällen eine sehr ähnliche Gesamtfaltung der Domäne (Grishin, 2001). Neben dieser Faltung setzt die RNA-Bindung einer KH-Domäne die Anwesenheit konservierter Reste um die zentrale Konsensus-Sequenz VIGXXGXXI voraus (Burd & Dreyfuss, 1994; De Boulle *et al.*, 1993; Garcia-Mena *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 1993; Jones & Schedl, 1995; Lewis *et al.*, 2000; Siomi *et al.*, 1994; Siomi *et al.*, 1993).



Beispiele für unterschiedliche Funktionen von KH-Domänen-Proteinen im RNA-Metabolismus sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1 Beispiele für KH-Domänen-Proteine im RNA-Metabolismus

Funktion	Protein	Zitat
RNA-Lokalisation	ZBP	(Ross <i>et al.</i> , 1997)
Translation	hnRNP K, hnRNP E1/E2 FMRP	(Ostareck <i>et al.</i> , 1997) (Brown <i>et al.</i> , 2001)
mRNA-Splicing	Nova-1 Mer-1 SF1 PSI	(Buckanovich & Darnell, 1997) (Jensen <i>et al.</i> , 2000) (Nandabalan & Roeder, 1995) (Engbrecht & Roeder, 1990) (Arning <i>et al.</i> , 1996) (Siebel <i>et al.</i> , 1995)
Shuttling Faktoren	hnRNP K	(Michael <i>et al.</i> , 1997)
RNA-Stabilität	Vigilin	(Cunningham <i>et al.</i> , 2000)

Die Funktion von Proteinen mit KH-Domänen ist nicht auf den RNA-Metabolismus beschränkt. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass KH-Domänen auch eine sequenzspezifische Bindung von DNA sowie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln

können (Baehrecke, 1997; Bomsztyk *et al.*, 1997; Cortes *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1997; Mahone *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1992; Zaffran *et al.*, 1997; Zorn & Krieg, 1997).

1.3 Die Vigilin-Proteinfamilie

Die Familie Vigilin-ähnlicher Proteine zeichnet sich durch die charakteristische Domänenorganisation ihrer Mitglieder aus: 14 oder 15 aufeinanderfolgende KH-Domänen decken über 90% der Proteinsequenz ab. Vigilin-ähnliche Proteine finden sich in vielen eukaryontischen Organismen von Hefe bis zum Menschen (Schmidt *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1997). Einzelnen Vertretern der Vigilin-Familie wurden in verschiedenen Modellorganismen Rollen bei der Zellaktivierung, bei der Proteinsynthese und Sekretion, im tRNA- und mRNA-Metabolismus, bei der Funktion von Heterochromatin oder bei der Teilung von ER- und Kernmembranen zugeordnet.

1.3.1 Vigilin in Vertebraten

Als erstes Mitglied der Vigilin-Familie wurde **Hühner-Vigilin** charakterisiert. Das Protein akkumuliert im Zytoplasma, daneben gibt es Hinweise auf eine Kernlokalisation. Die Expression von Hühner-Vigilin ist abhängig vom Differenzierungszustand und Alter der untersuchten Zellkulturen. Hohe Vigilin-Expressionsraten wurden nach Mitogen-Stimulation und in transformierten Zelllinien beschrieben. Aufgrund dieser Daten wurde eine Beteiligung von Vigilin bei der Zellaktivierung vorgeschlagen (Gan, 1993; Grünweller *et al.*, 1997; Henkel *et al.*, 1992; Neu-Yilik *et al.*, 1993; Plenz *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1992).

In **Säugetieren** wurde Vigilin durch seine hohe Homologie zum Hühner-Protein identifiziert (Plenz *et al.*, 1994). Ähnlich wie Hühner-Vigilin ist die Expression von Vigilin in Säuger-Zellen abhängig vom Differenzierungsstatus sowie der Proteinsynthese- und Sekretions-Aktivität des untersuchten Gewebes. Unter limitierenden Wachstumsbedingungen wird die Vigilin-Expression reprimiert (Kruse *et al.*, 1998a; Plenz *et al.*, 1994; Rumpel *et al.*, 1996). *In vitro* interagiert Vigilin mit hoher Affinität aber geringer Spezifität mit tRNA; *in vivo*-Daten deuten darauf hin, dass Säuger-Vigilin den tRNA-Export aus dem Zellkern beschleunigt (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000). Zwischen der zweiten und dritten KH-Domäne wurde ein funktionelles Kernlokalisations-Signal identifiziert. Konsistent damit liegt Säuger-Vigilin im Zytoplasma sowie im Zellkern vor (Klinger & Kruse, 1996; Kruse *et al.*, 1998a; Kruse *et al.*, 1998b; Kugler *et al.*, 1996). Im Zytoplasma assoziiert das Protein mit dem ER (Klinger & Kruse, 1996). Sowohl aus zytoplasmatischen als auch aus nukleären Extrakten wurde Säuger-Vigilin im Komplex mit tRNA und dem Translations-Elongationsfaktor eEF1 α aufgereinigt. Im nukleären Komplex konnten daneben der tRNA-spezifische Export-Rezeptor Exportin-t, im zytoplasmatischen Komplex eEF-1 β , γ und δ identifiziert werden (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000). Aufgrund seiner ER-Lokalisation sowie seiner hohen Expression in biosynthetisch und sekretorisch aktivem Gewebe wurde vorgeschlagen, dass

Vigilin eine Rolle bei der Synthese sekretorischer Proteine spielt. Daneben deuten die Daten auf eine Beteiligung von Vigilin beim Kernexport von tRNA hin (Klinger & Kruse, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000; Kugler *et al.*, 1996).

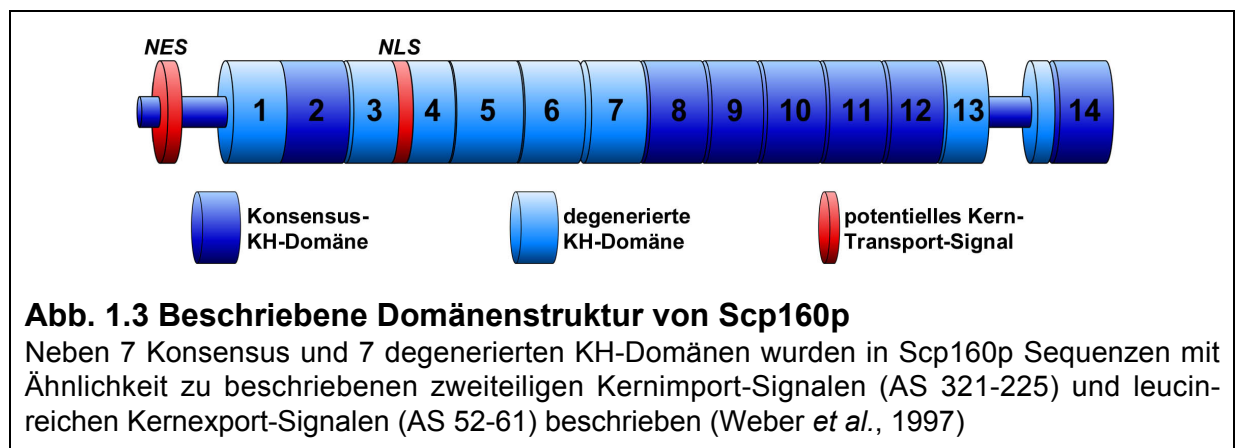
Xenopus laevis-Vigilin wurde durch seine hohe Affinität zum 3'-nichttranslatierten Bereich der *Vitellogenin* mRNA isoliert und charakterisiert (Dodson & Shapiro, 1997). Durch *in vitro* Selektion (SELEX) konnten RNA-Sequenzen identifiziert werden, an die Vigilin mit erhöhter Affinität bindet (Kanamori *et al.*, 1998): Diese Sequenzen zeichnen sich durch bestimmte Sequenzmotive, eine weitgehende Abwesenheit stabiler Sekundärstrukturen sowie eine Mindestlänge von etwa 75 Nukleotiden aus (Kanamori *et al.*, 1998). *In vitro*-Versuche mit gereinigten Komponenten deuten darauf hin, dass Vigilin die *Vitellogenin* mRNA selektiv vor Spaltung durch die sequenzspezifische mRNA Endonuklease PMR-1 schützt. *In vivo* korreliert die Stabilität der *Vitellogenin*-mRNA mit der Östrogen-abhängigen Induktion von Vigilin (Cunningham *et al.*, 2000; Dodson & Shapiro, 1997). Die veröffentlichten experimentellen Daten schlagen vor, dass *Xenopus*-Vigilin durch differentielle Stabilisierung spezifischer mRNAs eine Rolle bei der Vermittlung einer zellulären Antwort auf einen Hormon- oder Proliferations-Stimulus spielt.

1.3.2 DDP1 in *Drosophila melanogaster*

DDP1 (Cortes *et al.*, 1999) wurde als ein Einzelstrang-DNA bindendes Protein in *Drosophila melanogaster* charakterisiert. Eine aufgrund der 15 aufeinanderfolgenden KH-Domänen vermutete Zugehörigkeit zur Vigilin-Proteinfamilie wurde anhand der Komplementation der Phänotypen eines *scp160Δ*-Stammes in Hefe bestätigt (Cortes *et al.*, 1999). DDP1 wurde entwicklungsabhängig nach der Zellularisierung im Zellkern lokalisiert (Cortes *et al.*, 1999). An polytären Riesen-Chromosomen assoziiert DDP1 am Chromozentrum mit perizentrischem Heterochromatin. Daneben wurde es an unterschiedlichen Loci im Heterochromatin und Euchromatin von Interphase-Kernen nachgewiesen (Cortes *et al.*, 1999). Die Interaktion von DDP1 mit dem unstrukturierten C-Strang zentromerer Dodekasatellit-DNA ist sequenzspezifisch. *In vitro* benötigt die Interaktion eine Mindestlänge der DNA von 75 bis 100 Nukleotiden und wird durch die Abwesenheit von Sekundärstrukturen in der DNA erleichtert (Cortes & Azorin, 2000; Cortes *et al.*, 1999). Aufgrund der Lokalisation an Heterochromatin in unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurde spekuliert, dass DDP1 eine Rolle bei der Organisation und Funktion von Heterochromatin spielt (Cortes & Azorin, 2000).

1.3.3 Scp160p in Hefe

Das Hefeprotein Scp160p besteht weitgehend aus 14 aufeinanderfolgenden KH-Domänen (Wintersberger *et al.*, 1995). Nur die N-terminalen etwa 100 Aminosäuren sind nicht Bestandteil einer KH-Domäne. Aufgrund dieses Domänenaufbaus wurde vorgeschlagen, dass es sich bei Scp160p um ein Protein aus der konservierten Vigilin-Familie handelt. Im Gegensatz zu allen anderen charakterisierten Vertretern der Vigilin-Proteinfamilie sind 7 der 14 KH-Domänen von Scp160p degeneriert und weisen Abweichungen innerhalb des zentralen GXXG-Motivs auf (Abb. 1.3). Neben den KH-Domänen wurde ein mögliches Kernlokalisations-Signal sowie ein mögliches Kernexport-Signal beschrieben (Weber *et al.*, 1997).



Konsistent mit seinem modularen Aufbau aus KH-Domänen hat Scp160p *in vitro* eine Affinität für Ribohomopolymere, ribosomale RNA sowie einzelsträngige und doppelsträngige DNA (Weber *et al.*, 1997).

Deletion von *SCP160* führt zu charakteristischen Phänotypen: Ein *scp160Δ*-Stamm ist lebensfähig, zeigt jedoch eine anormale Morphologie mit vergrößerten Zellen und fragmentierten Vakuolen sowie eine reduzierte Anzahl teilungsfähiger Zellen. Ein im *scp160Δ*-Stamm beschriebener Chromosomensegregationsdefekt führt zu einem irreversibel erhöhten DNA-Gehalt sowie beim Kreuzen von *scp160Δ*-Stämmen mit einem Wildtyp-Stamm zur unregelmäßigen Verteilung genetischer Marker (Wintersberger *et al.*, 1995).

Scp160p wurde nahe der Kernmembran und dem ER lokalisiert. Die Abwesenheit einer Signalsequenz oder einer potentiellen Transmembran-Domäne legt nahe, dass Scp160p mit der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) interagiert (Wintersberger *et al.*, 1995). *In vitro* führen Bedingungen, die eine Ablösung von Ribosomen vom ER bewirken, ebenso wie hohe Salzkonzentrationen zu einer Freisetzung von Scp160p (Weber *et al.*, 1997). Lang und Kollegen (Lang & Fridovich-Keil, 2000) konnten einen zytoplasmatischen Komplex aus Scp160p und Polysomen identifizieren. Dem widersprechen jedoch Daten einer anderen Gruppe (Weber *et al.*, 1997), die keine Assoziation von Scp160p mit zytoplasmatischen Polysomen nachweisen konnten. Nach EDTA-Behandlung von Extrakten wurde Scp160p

in einem RNase- und salzsensitiven Komplex von etwa 1,3MDa Größe gefunden (Lang & Fridovich-Keil, 2000). Affinitäts-Chromatographie führte zu Identifizierung von Pab1p (Poly(A)-bindendes Protein) und Bfr1p (BrefeldinA Resistenz-Protein) als Bestandteil dieses Komplexes (Lang & Fridovich-Keil, 2000).

Aufgrund der veröffentlichten Daten wurde eine Beteiligung von Scp160p an unterschiedlichen zellulären Prozessen vorgeschlagen: Wintersberger und Kollegen spekulieren über eine Funktion von Scp160p bei der korrekten Verteilung der ER- und Kern-Membranen während der Zellteilung (Wintersberger *et al.*, 1995). In einer nachfolgenden Veröffentlichung (Weber *et al.*, 1997) sieht die gleiche Gruppe eine mögliche Funktion von Scp160p im Export von RNA aus dem Zellkern oder dem Transport von RNA im Zytoplasma. Eine andere Gruppe beschreibt eine mögliche Funktion von Scp160p im mRNA-Metabolismus und spekuliert über eine Rolle von Scp160p als Verbindungsglied zwischen Chromosomensegregation und mRNA-Metabolismus (Lang & Fridovich-Keil, 2000; Lang *et al.*, 2001).

Tabelle 1.2 fasst die Eigenschaften der charakterisierten Mitglieder der Vigilin-Proteinfamilie in unterschiedlichen Organismen zusammen.

Tabelle 1.2 Eigenschaften von Proteinen der Vigilin-Familie

Protein	Organismus	KH-Dom./ davon degeneriert	<i>in vivo</i> - RNA/DNA- Bindung	Lokalisation	Inter- aktions- Partner	Expression	hypothetische Funktion
Vigilin	Huhn	15 / 15	n.b.	Zytoplasma, Interaktion mit Kernextrakten	n.b.	abhängig von Entwicklung, Differenzierung	Zellaktivierung
Vigilin	Säuger	15 / 15	tRNA	Zytopl.: ER Zellkern	eEF-1 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ eEF1 α , Exportin-t	abhängig von Entwicklung, Differenzierung, Proteinsynthese	Proteinsynthese und Sekretion tRNA-Transport
Vigilin	<i>Xenopus laevis</i>	14 / 14	mRNA	Zytoplasma	n.b.	Östrogen- induziert	mRNA-Stabilität
DDP1	<i>Drosophila melano- gaster</i>	15 / 15	ssDNA	entwicklungs- abhängig im Zellkern	n.b.	n.b.	Funktion von Heterochromatin
Scp160p	<i>Saccharo- myces cerevisiae</i>	14 / 7	n.b.	Zytoplasma: -ER -Polysomen?	Bfr1p,Pab1p	n.b.	Teilung von ER- und Kern- membranen; RNA- Metabolismus Translation

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden von Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Die Bezugsquelle spezieller Chemikalien ist an entsprechender Stelle erwähnt.

2.1.2 Enzyme

Standard-Enzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Roche (Mannheim) oder Amersham-Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen. Die Bezugsquelle spezieller Enzyme ist an entsprechender Stelle erwähnt.

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2.1 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primär-Antikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung (Western-Blot)	Quelle/Zitat
Scp160p	Kaninchen	1:10000-1:30000	(Frey <i>et al.</i> , 2001)
Rps3p	Kaninchen	1:150000-1:500000	(Frey <i>et al.</i> , 2001)
Rpl35p	Kaninchen	1:25000-1:100000	(Frey <i>et al.</i> , 2001)
Kar2p	Kaninchen	1:10000-1:30000	Hergestellt nach (Rose <i>et al.</i> , 1989)
Zwf1p	Kaninchen	1:20000-1:60000	Sigma (Taufkirchen) (A9521)
Sec61p	Kaninchen	1:10000-1:30000	Herstellung nach (Stirling <i>et al.</i> , 1992)
GFP	Kaninchen	1:3000-1:10000	Seedorf, 1999 #212]

Als Sekundär-Antikörper für Western-Blots wurde je nach Herkunft des Primär-Antikörpers Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Antikörper aus Ziege (Sigma, Taufkirchen) in einer Verdünnung von 1:5000-1:20000 eingesetzt.

2.1.4 Größen-Standards

Als Größenstandard für **DNA** wurde die 1kb DNA-Leiter von GibcoBRL (Invitrogen, Karlsruhe) sowie der DNA-Marker VI von Roche (Mannheim) eingesetzt. Zur Größenbestimmung kleiner DNA-Fragmente wurde die 10bp-Leiter von Stratagene (La Jolla, CA, USA) mit T4-Polynukleotidkinase (Stratagene) nach Anleitung mit γ -³²P-ATP markiert. Als Größenstandard für **RNA** wurde der RNA-Marker von Promega (Madison, WI, USA), als Größenstandard für **Proteine** die High Molecular Weight Standard Mixture für SDS-PAGE von Sigma (Taufkirchen) sowie der Prestained SDS-PAGE Standard "high range" von NEB (Beverly, MA, USA) verwendet.

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (München), BioSpring (Frankfurt) oder der haus-eigenen Oligonukleotid-Synthese des ZMBH (Heidelberg) in Auftrag gegeben, in einer Konzentration von 50µM in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Tabelle 2.2 zeigt eine Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Die verwendete Farbkodierung symbolisiert:

rot: eingeführte Restriktionsschnittstellen oder Polymerase-Erkennungssequenzen

blau: eingeführte Mutationen im Vergleich zur *WT* Sequenz

Tabelle 2.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Gen	Orientierung	5'-Ende	3'-Ende	relativ zu	eingeführte Restriktions-Schnittstellen	Kommentar
SFSCP1	GgaattcGGATGGAATCTTTGACCTTTC	SCP160	rückwärts	1008	988	ATG	EcoRI	
SFSCP2	CCatcgaTGCCTCGTGAAAGGCAAAAG	SCP160	vorwärts	913	931	ATG	ClaI	
SFSCP3	GAGCAAGGTATACGGCC	ADH	vorwärts	-192	-170	ATG	-	
SFSCP6	CCatcgaTGTCTGAAGAACAAACCGCTATTGAC	SCP160	vorwärts	1	25	ATG	ClaI	
SFSCP7	GgaattcCAAAATAATCTTGAATAGATGCTCTCGTGGC	SCP160	rückwärts	960	931	ATG	EcoRI	
SFSCP8	GgaattcTTTAGACGTAGAGAGTTTAATGACTCATTTG	SCP160	rückwärts	1665	1635	ATG	EcoRI	
SFSCP11	cgATGCCCAAGAAAGCGGAAGGTGGCTgTgaag	SV40-NLS	vorwärts	-	-	-	ClaI-Sall-EcoRI	paart mit SFSCP15
SFSCP13	GgtcgaacGGCTTCGGCAACAATGGATTCC	SCP160	rückwärts	2574	2554	ATG	Sall	
SFSCP14	GgtcgaacTCTCTTAAGGATTTCAAAACCAATTC	SCP160	rückwärts	3666	3640	ATG	Sall	
SFSCP15	aattcgtcgaacAGCCACCTTCGCTCTCTCTTGGGCat	SV40-NLS	vorwärts	-	-	-	EcoRI-Sall-ClaI	paart mit SFSCP11
SFSCP16	GgtcgaacTTTTTGGCTTCGGCAGCC	SCP160	rückwärts	2124	2106	ATG	Sall	
SFSCP17	GgtcgaacTCCCTCGATTATTTCAATCAAGATTTTC	SCP160	rückwärts	3024	2997	ATG	Sall	
SFSCP18	GgaattcGACCGCATTTGATTGGTTTTG	SCP160	rückwärts	543	524	ATG	EcoRI	
SFSCP19	GgaattcAGTAGTCAATGAACGACGAGAAGG	SCP160	rückwärts	291	268	ATG	EcoRI	
SFSCP20	CCatcgaTGGGCTTTGGGCGCAAGG	SCP160	vorwärts	292	309	ATG	ClaI	
SFSCP22	GgaattcAGAAACATCATGATTTTCTTAACAGATTGG	SCP160	rückwärts	426	396	ATG	EcoRI	
SFSCP23	CCatcgaTGGTGAATCAACTCTTCTAAGATGTC	SCP160	vorwärts	427	452	ATG	ClaI	
SFSCP24	GgtcgaacCGATGGAGAAATTCAAAATAGATTTC	SCP160	rückwärts	1896	1873	ATG	Sall	
SFSCP25	GgtcgaacAGCATCTTGACAATCTTG	SCP160	rückwärts	2808	2790	ATG	Sall	
SFSCP33	ATTCatcgaTATCCAAGAGGCTTTCACTTTGG	SCP160	vorwärts	325	346	ATG	ClaI	
SFSCP34	TCGgaattcCGACAAATACGAGATAATTCAGGTTTGG	SCP160	vorwärts	396	371	ATG	EcoRI	
SFSCP35	CaagatcCCATCCGAAGTCaTgGCTAGC	SCP160	rückwärts	1	9	ATG	BglII	
SFSCP36	CGGAATTAAACCTCACTAAAGGG	GFP	vorwärts	-	-	-	-	T3-Primer
SFSCP37	CCGgaattcgtcgaactagacAAAGCTCTTTGAAACG	SCP160	vorwärts	-3	17	STOP	EcoRI-Sall-Stop	
SFSCP38	GCtctagaCGGAAACTTCGTCGCC	SCP160	rückwärts	333	314	STOP	XbaI	
SFSCP41	CGCggatccTTTTTGACACCAGCAACTGG	LACZ	rückwärts	-	-	STOP	BamHI	
SFSCP42	ActcgaTCTGTCGTTTTACACGTGACTGGG	LACZ	vorwärts	204	227	ATG	XhoI/Aval	
SFSCP43	CgagctcggatccTCTTCTCATCTTCTTAAATGTTCCG	SCP160	vorwärts	-627	-594	ATG	SacI-BamHI	
SFSCP44	CactagTCATTGAGATTATATGGAAGGAGGGGG	SCP160	rückwärts	-24	3	ATG	SpeI	
SFSCP45	GcaactccactggTACTGAGAGTGCACACGC	URA3	vorwärts	-242	-224	ATG	BstXI	
SFSCP46	CcaagtgagagggCGGGTATTCACACCGCAGGG	URA3	rückwärts	96	76	STOP	BstXI	
SFSCP47	GactagiAAAGGAGAAAGAACTCTTCACTGGAGTTG	GFP	vorwärts	4	32	ATG	SpeI	
SFSCP51	CatcgaTAAAGAGGATGCaTTCAGAACTCAAG	SCP160	vorwärts	304	331	ATG	ClaI	
SFSCP52	GgaattcAGCATCCaCTGGCCCAAGGCCAG	SCP160	rückwärts	315	290	ATG	EcoRI	
SFSCP53	GcggcgcgATCAGAGCAATTGTAC	Marker	vorwärts	-	-	-	NotI	annealt an Sik-Vekt.
SFSCP54	CgagctcCTTACGCATCTGTGC	Marker	rückwärts	-	-	-	SacI	annealt an Sik-Vekt.
SFSCP58	CatcgaTATCCTTTGTATAGTTCATCC	GFP	rückwärts	713	699	ATG	ClaI	
SFSCP59	CgagctcGACAAGCTCTTTGAAACG	SCP160	vorwärts	-1	23	STOP	SacI	
SFSCP60	CgagctcCTTATCTGCAAGTGTATTTACCG	SCP160	rückwärts	440	418	STOP	SacI	
SFSCP76	CactagiGGATCAGAGCAGATTGAC	Marker	vorwärts	-	-	-	SpeI	annealt an Sik-Vekt.
SFSCP77	CgtcgaacTCTTACGCATCTGTGC	Marker	rückwärts	-	-	-	SacI	annealt an Sik-Vekt.
SFSCP78	CgtcgaacGACAAGCTCTTTGAAACG	SCP160	vorwärts	-1	16	STOP	Sall	
SFSCP79	CgglaccAGTCTATGACTAGACCG	SCP160	rückwärts	533	516	ATG	KpnI	KO-Verifik. SCP160
SFSCP80	CGAAGGCAATACCCGATATGTGG	SCP160	vorwärts	-688	-663	ATG	-	KO-Verifik. SCP160
SFSCP81	GCAATGCCCATTGGCCACTGTCTCTGTGC	SCP160	rückwärts	569	542	STOP	-	für Northern-Sonde
SFSSH123	cgattagtgagacactatagGCACCTGGAACACCCAGAC	SSH1	rückwärts	1466	1447	ATG	SP6	
SFSSH135	CAGcgccgcgCTGTGGTTTCTGCTCAATTG	SSH1	vorwärts	3	22	ATG	NotI	
SFSCP139	CaagatcatcgaTCCATCAGGTATTCATCCACTCC	SCP160	vorwärts	-445	-424	ATG	BglII-ClaI	

Name	Sequenz (5'-3')	Gen	Orientierung	5'-Ende	3'-Ende	relativ zu	eingeführte Restriktions-Schnittstellen	Kommentar
SFSCP140	C <a>agctt GCAGTTATAATGGAAGGAGG	SCP160	rückwärts	-1	-20	ATG	HindIII	für Northern-Sonde
SFGPD146	GGCCACTTGAATGCTGG	GPD1	vorwärts	37	53	ATG	-	für Northern-Sonde
SFGPD147	GGCAGGTTCTTCATTGGG	GPD1	rückwärts	1139	1122	ATG	-	für Northern-Sonde
SFERG11-150	GCTACCAAGTCAATCGTTGG	ERG11	vorwärts	7	26	ATG	-	für Northern-Sonde
SFERG11-151	CCAGATGATCTTGCTGGACC	ERG11	rückwärts	1563	1543	ATG	-	für Northern-Sonde
SFFIT1-152	GCTATCACCGTTGCCGCTTTAGG	FIT1	vorwärts	31	53	ATG	-	für Northern-Sonde
SFFIT1-153	CGTGTAATCACGATTGAGG	FIT1	rückwärts	1515	1495	ATG	-	für Northern-Sonde
SFFIT2-154	CTCAACTATTTTCGGAGCTACTAC	FIT2	vorwärts	9	32	ATG	-	für Northern-Sonde
SFFIT2-155	GGTAAGAAATCAACCAAGGG	FIT2	rückwärts	454	434	ATG	-	für Northern-Sonde
SFFIT3-156	CTCCGCTTTGGTTCTATCTGC	FIT3	vorwärts	11	32	ATG	-	für Northern-Sonde
SFFIT3-157	CAATAACATGACGGCAGCAAGG	FIT3	rückwärts	612	591	ATG	-	für Northern-Sonde
SFGAS5-160	GCTGGTTGGCTCAGGCTGC	GAS5	vorwärts	40	59	ATG	-	für Northern-Sonde
SFGAS5-161	GTTCTGCCAAGCACGG	GAS5	rückwärts	1435	1419	ATG	-	für Northern-Sonde
SFVPH1-162	GGCAGAGAAAGGAGGAAAGCG	VPH1	vorwärts	3	21	ATG	-	für Northern-Sonde
SFVPH1-163	GAAGCGGAAGAGCTTGCAC	VPH1	rückwärts	2516	2498	ATG	-	für Northern-Sonde
SFRPL25-164	CTGCTAAGGCTACTGCGGCTAAG	RPL25	vorwärts	11*	33*	ATG	-	für Northern-Sonde
SFRPL25-165	GTCCAAAGCATCGTAGTCAGCAGTC	RPL25	rückwärts	402*	378*	ATG	-	für Northern-Sonde
SFSBP1-166	CAACTGAGCATCAAGACTCC	SBP1	vorwärts	39	60	ATG	-	für Northern-Sonde
SFSBP1-167	GCTTTTCTTCAGAACACAGTTTCTTGC	SBP1	rückwärts	877	852	ATG	-	für Northern-Sonde
SFVPH1-170	GCAAGCTCTCCGCTTCAAGC	VPH1	vorwärts	2500	2520	ATG	-	für Northern-Sonde
SFSBP1-173	GCAAGAAACTGGTTCTGAAGAAAGC	SBP1	vorwärts	852	877	ATG	-	RACE-PAT
Anker(dT) ₁₂₋₁₈₁	CGGAGCTCCGCGCGCGTTTTTTTTTTT	-	-	-	-	-	-	RACE-PAT
SFRPL25-185	CGAAGTTGACGTATTGAAGGTTAACAC	RPL25	vorwärts	309*	335*	ATG	-	RACE-PAT
SFGAS5-186	CACCCCGCTTCTTTACCCACATTG	GAS5	vorwärts	1461	1483	ATG	-	RACE-PAT
SFSIM1-187	ATCCAAGTGAACTTGTTAGACGACC	SIM1	vorwärts	1586	1610	ATG	-	RACE-PAT
MSSCP3	CGCTTAAATATACTCCACACCCCTCCTCCATTACTGAG	SCP160	vorwärts	-46	-1	ATG	-	SCP160-KO-Primer
MSSCP4	GCCAAATCTATATTGAAAAAATTGGTTCAAAGAGCTT	SCP160	rückwärts	42	2	STOP	-	SCP160-KO-Primer
SFRPL11-1	G <a>gaattc GGTCTTGAACATCTCCGTTGG	RPL11B	vorwärts	51	71	ATG	EcoRI	
SFRPL11-2	G <a>ctcgag ATTATCGAGCACATCAGCGTCGTACTTTTTCCTTGAACC	RPL11B	rückwärts	492	523	ATG	XhoI	

* Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz der mRNA

2.1.6 Plasmide

Tabelle 2.3 Im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmide

Name	Spezifizierung			Klonierung			
	Pro-motor	Konstrukt	Vektor-Rückgrat	Vektor	PCR-Template	Primer1	Primer2
pSF1	ADH1	Scp305-335-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 EcoRI/Clal	Yep13/6	SFSCP1	SFSCP2
pSF14	ADH1	Scp1-320-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 EcoRI/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP7
pSF15	ADH1	Scp1-320-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pPS1525 EcoRI/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP7
pSF16	ADH1	Scp1-555-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 EcoRI/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP8
pSF17	ADH1	Scp1-555-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pPS1525 EcoRI/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP8
pSF18	ADH1	Scp1-858-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Sall/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP13
pSF19	ADH1	Scp1-858-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF23 Sall/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP13
pSF20	ADH1	Scp1-1222-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Sall/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP14
pSF21	ADH1	Scp1-1222-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF23 Sall/Clal	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP14
pSF22	ADH1	SV40-NLS-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 Clal/EcoRI	annealte Oligonukleotide SFSCP11 und SFSCP15		
pSF24	ADH1	2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF1 EcoRI/NotI	pSF25 EcoRI / NotI		
pSF25	ADH1	2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF17 EcoRI/Clal T4-Polymerase			
pSF26	ADH1	Scp1-708-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP16
pSF27	ADH1	Scp1-708-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF23 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP16
pSF28	ADH1	Scp1-1008-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF18 Clal/Sall	pSF29 Clal/Sall		
pSF29	ADH1	Scp1-1008-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF23 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP17
pSF30	ADH1	Scp1-97-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 Clal/EcoRI	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP19
pSF32	ADH1	Scp1-181-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 Clal/EcoRI	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP18
pSF40	ADH1	Scp98-142-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF20 Clal/EcoRI	Yep13/6	SFSCP20	SFSCP22
pSF44	ADH1	Scp1-632-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF20 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP24	SFSCP6
pSF46	ADH1	Scp1-936-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF20 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP25	SFSCP6
pSF54	ADH1	SV40-NLS-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pPS1372 SmaI/XhoI	pPS1372 EcoRV / XhoI		
pSF57	ADH1	4xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF24 BamHI/HindIII	pSF1	SFSCP35	SFSCP36
pSF60	ADH1	Scp143-632-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP24	SFSCP23
pSF62	ADH1	Scp98-132-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP20	SFSCP34
pSF64	ADH1	Scp109-132-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP33	SFSCP34
pSF66	ADH1	Scp109-142-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF22 Clal/Sall	Yep13/6	SFSCP22	SFSCP33
pSF69	ADH1	sGFP-LacZ/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	pSF24 XhoI/BamHI	pUHD16-1	SFSCP42	SFSCP41
pSF72	-	SCP-3'-UTR	pBlueScript	pBS EcoRI/XbaI	Yep13/6	SFSCP37	SFSCP38
pSF79	SCP160	P _{SCP160} (-625/+6)	pBlueScript	pBS SacI/SpeI	Yep13/6	SFSCP43	SFSCP44
pSF80	SCP160	P _{SCP160} (-625/-426)/URA3/P _{SCP160} (-425/+6)	pBlueScript	pSF79 BstXI, AP	pRS316	SFSCP45	SFSCP46
pSF81	SCP160	P _{SCP160} /URA3/P _{SCP160} /Scp1-632	pBlueScript	pSF80 Clal/Sall	pSF44 Clal/Sall		
pSF84	SCP160	P _{SCP160} (-625/-1)/Scp1-100(ΔNLS)	pBlueScript	pBS SacI/EcoRI	Yep13/6	SFSCP43	SFSCP52
pSF85	SCP160	P _{SCP160} (-625/-1)/Scp1-632(ΔNLS)	pBlueScript	pSF84 NsiI/Sall	Yep13/6	SFSCP51	SFSCP24
pSF86	SCP160	P _{SCP160} /URA3/P _{SCP160} /Scp1-632(ΔNLS)	pBlueScript	pSF85 BstXI AP	pRS316	SFSCP45	SFSCP46
pSF87	ADH1	Scp100-320(NLSmut)-2xGFP/NUF2-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF17 Clal/EcoRI	Yep13/6	SFSCP51	SFSCP7
pSF88	ADH1	Scp1-320(NLSmut)-2xGFP/NUF2-UTR	pRS314 CEN TRP1	pSF87 Clal/NsiI	Yep13/6	SFSCP6	SFSCP52
pSF89	-	SCP160-3'-UTR/TRP1	pBlueScript	pSF72 NotI/SacI	pRS316	SFSCP53	SFSCP54
pSF96	SCP160	P _{SCP160} /URA3/P _{SCP160} /sGFP-Scp1-632	pBlueScript	pSF81 SpeI/Clal	pMS356	SFSCP47	SFSCP58
pSF98	-	SCP160-3'-UTR/TRP1/SCP160-3'-UTR	pBlueScript	pSF89 SacI/AP	Yep13/6	SFSCP59	SFSCP60
pSF99	-	Scp76-320/SCP-3'-UTR/TRP1/SCP-3'-UTR	pBlueScript	pSF98 ApaI/EcoRI	pSF15 ApaI/EcoRI		
pSF100	-	Scp76-555/SCP-3'-UTR/TRP1/SCP-3'-UTR	pBlueScript	pSF98 ApaI/EcoRI	pSF17 ApaI/EcoRI		
pSF101	-	Scp76-708/SCP-3'-UTR/TRP1/SCP-3'-UTR	pBlueScript	pSF98 ApaI/Sall	pSF27 ApaI/Sall		
pSF102	-	Scp76-858/SCP-3'-UTR/TRP1/SCP-3'-UTR	pBlueScript	pSF98 ApaI/Sall	pSF19 ApaI/Sall		
pSF103	-	Scp76-1008/SCP-3'-UTR/TRP1/SCP-3'-UTR	pBlueScript	pSF98 ApaI/Sall	pSF29 ApaI/Sall		
pSF104	-	Scp76-1222/SCP-3'-UTR/TRP1/SCP-3'-UTR	pBlueScript	pSF98 ApaI/Sall	pSF21 ApaI/Sall		
pSF105	-	Rpl11BΔN17-sGFP/NUF2-3'-UTR	pRS406 int URA3	pMS356 EcoRI/XhoI	pPS2167	SFRPL11-1	SFRPL11-2
pSF157	P _{GAL} /SCP	P _{SCP160} /URA3/P _{GAL} /SCP-SCP160	pYE URA3	pYE SCP* BglII/HindIII	Yep13/6	SFSCP139	SFSCP140

Tabelle 2.4 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fremdplasmide

Name	Alias-Name	Konstrukt	Vektor-Rückgrat	Zitat / Quelle
pMS92	pSF4	P _{se1ΔN-ZZ-His} /NUF2-3'-UTR	pRS404 int TRP1	Laborstock M.Seedorf, Heidelberg
pMS95	pSF5	P _{se1ΔN-ZZ-His} /NUF2-3'-UTR	pRS406 int URA3	Laborstock M.Seedorf, Heidelberg
pMS346	-	SCP160	pRS315 CEN LEU2	Laborstock M.Seedorf, Heidelberg
pMS356	pSF6	Scp823-1221-sGFP/NUF2-3'-UTR	pRS406 int URA3	(Frey <i>et al.</i> , 2001)
pPS1372	pSF2	P _{ADH} /SV40-NLS-PKI-NES-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS316 CEN URA3	(Taura <i>et al.</i> , 1998)
pPS1525	pSF3	P _{ADH} /SV40-NLS-PKI-NES-2xGFP/NUF2-3'-UTR	pRS314 CEN TRP1	(Taura <i>et al.</i> , 1998)
pPS2167	pMS422	Rpl11B-GFP	LEU2	(Stage-Zimmermann <i>et al.</i> , 2000)
pUHD16-1		LacZ		Laborstock H.Bujard, Heidelberg
Yep13/6	pSF7	SCP160 + ACT3 genomische Sequenzen	Yep13	(Wintersberger <i>et al.</i> , 1995)
pJK59	pMS329	P _{SEC63} /SEC63-GFP(S65T V163A)	CEN / URA3	(Prinz <i>et al.</i> , 2000)
2μ URA3 SIM1	pCJ63	SIM1	2μ / URA3	(Du & Novick, 2002)
pRS314		-	CEN / TRP1	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS315		-	CEN / LEU2	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS316		-	CEN / URA3	(Sikorski & Hieter, 1989)
pYE SCP*	pMS345	P _{GAL} /SCP160	pYE URA3	Laborstock U. Wintersberger, Wien

- **genomische Hefe-Bibliothek**

Zur Amplifikation fremder Gene mittels PCR wurde als Template eine chromosomale Hefe-Bibliothek (Rose *et al.*, 1987) verwendet.

- **Charakterisierung von Yep13/6**

Das als Template für die Amplifikation von *SCP160*- oder *SCP160*-Fragmenten verwendete Plasmid Yep13/6 (Wintersberger *et al.*, 1995) wurde durch redundante Sequenzierungen des enthaltenen *SCP160*-Allels sowie unabhängiger subklonierter Genfragmente charakterisiert. Die Sequenzierungen wurden bei der Firma Medigenomix (Martinsried) in Auftrag gegeben. Die erhaltene Sequenz wurde der veröffentlichten Sequenz des identischen Klons sowie der in der SGD (*Saccharomyces Genome Database*) verfügbaren *SCP160*-Sequenz im S288c-Stammhintergrund (Cherry, 2002) gegenübergestellt.

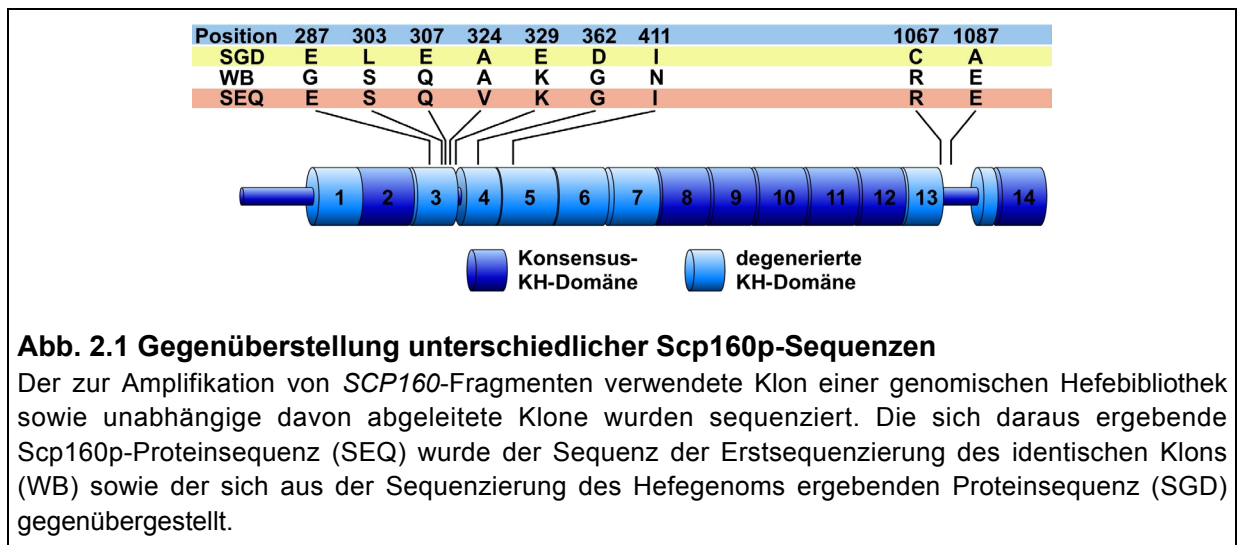


Abb. 2.1 Gegenüberstellung unterschiedlicher Scp160p-Sequenzen

Der zur Amplifikation von *SCP160*-Fragmenten verwendete Klon einer genomischen Hefebibliothek sowie unabhängige davon abgeleitete Klone wurden sequenziert. Die sich daraus ergebende Scp160p-Proteinsequenz (SEQ) wurde der Sequenz der Erstsequenzierung des identischen Klons (WB) sowie der sich aus der Sequenzierung des Hefegenoms ergebenden Proteinsequenz (SGD) gegenübergestellt.

Die neue Sequenzierung des von Wintersberger und Kollegen isolierten genomischen *SCP160*-Klons (Wintersberger *et al.*, 1995) weicht auf DNA-Ebene sowohl von der SGD-Sequenz des *SCP160*-Gens als auch von der Erstsequenzierung des gleichen Klons ab. Sequenzunterschiede, die zum Austausch von Aminosäuren (AS) in Scp160p führen, sind in Abb. 2.1 zusammengefasst. Stille Mutationen wurden nicht berücksichtigt. Die zwei von Sequenzierungen des identischen genomischen Klons abgeleiteten Scp160p-Sequenzen (WB und SEQ) unterscheiden sich in drei Positionen (AS 287, 324 und 411). In zwei der drei Fälle (AS 287 und 411) stimmt die neue Sequenzierung (SEQ) mit der Datenbank-Sequenz (SGD) überein. Mutmaßlich sind diese Abweichungen daher auf Fehler bei der Erstsequenzierung (Wintersberger *et al.*, 1995) zurückzuführen. In einem Fall (AS 324) weichen alle neuen Sequenzierungen (SEQ) von den übereinstimmenden Sequenzen der Erstsequenzierung (WB) sowie der Datenbank ab. Die Ursache dieser Abweichung ist ungeklärt. In weiteren 6 Positionen (AS 303, 307, 329, 362, 1067 und 1087) unterscheiden sich beide abgeleiteten Proteinsequenzen des genomischen Klons übereinstimmend von der Datenbanksequenz. Diese Unterschiede repräsentieren demnach genetische Polymorphismen, die in unterschiedlichen Stammhintergründen von *Saccharomyces cerevisiae* zu veränderten Proteinsequenzen führen. Der Austausch von endogenem *WT-SCP160* durch artifizielle, aus dem genomischen Klon abgeleitete *WT-SCP160*-Gene führt zu Stämmen, die sich phänotypisch nicht vom Ausgangsstamm unterscheiden (nicht gezeigt). Insbesondere treten keine Defekte auf, die typisch für Zellen ohne funktionelles Scp160p sind (Wintersberger *et al.*, 1995). Das sequenzierte *SCP160*-Allel kann daher als dem genomischen *SCP160* funktionell äquivalent betrachtet werden.

2.1.7 Organismen

2.1.7.1 Hefestämme

Die verwendete genetische Nomenklatur richtet sich nach (Sherman, 1997). *WT*-Gene sind im Allgemeinen nicht gesondert erwähnt. Spezielle Bezeichnungen werden im Folgenden erklärt:

- SCP160*(Δ NLS): ein die Aminosäure-Substitutionen K102Q, R103W, R105H und K107E kodierendes *SCP160*-Allel
- scp160*-(*n-m*): ein die Aminosäuren *n* bis *m* kodierendes, nichtfunktionelles *SCP160*-Fragment
- P_{GAL/SCP}*: eine Fusion des *GAL1*-Promotors mit einem Teil des *SCP160*-Promotors

Tabelle 2.5 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefe-Stämme

Name	Genotyp	Konstruktion	Ausgangs-Stamm
SFY4	<i>MATa SCP160-GFP::URA3 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF6 (Tth111I)	FY23
SFY5	<i>MATa GFP-SCP160::URA3 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF96 (EcoRI/BamHI)	FY23
SFY9	<i>MATa scp160-(1-320)::TRP1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF99 (ApaI/PstI)	FY23
SFY10	<i>MATa scp160-(1-555)::TRP1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF100 (ApaI/PstI)	FY23
SFY11	<i>MATa scp160-(1-708)::TRP1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF101 (ApaI/PstI)	FY23
SFY12	<i>MATa scp160-(1-858)::TRP1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF102 (ApaI/PstI)	FY23
SFY13	<i>MATa scp160-(1-1008)::TRP1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF103 (ApaI/PstI)	FY23
SFY14	<i>MATa SCP160::TRP1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF104 (ApaI/PstI)	FY23
SFY16	<i>MATa RPL11B-GFP::URA3 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF105 (AgeI)	FY23
SFY17	<i>MATa SCP160(ΔNLS)::URA3 ura3-52 leu2 lys1 ade2 ade8 his3</i>	Integration von pSF86 (EcoRI/BamHI), Sporulation	PSY613
SFY19	<i>MATa ura3 leu2 lys1 ade2 ade8 his3</i>	wie SFY17	PSY613
SFY49	<i>MATa scp160::TRP1 ura3-1 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Einschritt-Gen austausch (PCR)	FY23
SFY72	<i>MATa P_{GAL/SCP}-SCP160::URA3 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Integration von pSF157 (BstXI)	FY23

Tabelle 2.6 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestämme, die nicht selbst hergestellt wurden

Name	Alias-Name	Genotyp	Herkunft/Zitat
FY23	MSY45	<i>S288C MATa ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	(Winston <i>et al.</i> , 1995)
PSY613	MSY78	<i>S288C MATa/α ura3/ura3 leu2/leu2 lys1/lys1 ade2/ade2 his3Δ200/his3Δ200 ade8/ade8</i>	Laborstock P.Silver, Boston
<i>prp20-1</i>	MSY47	<i>MATa prp20-1 ura3-52 lys2-801 ade2-101 his3Δ200</i>	Laborstock P.Silver, Boston
<i>rat7-1</i>	MSY49	<i>MATα rat7-1 ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i>	(Gorsch <i>et al.</i> , 1995)
<i>rpb1-1</i>	MSY55	<i>MATa rpb1-1 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	(Nonet <i>et al.</i> , 1987)
<i>rna1-1</i>	MSY57	<i>MATa rna1-1 ura3-52 trp1 leu2Δ1</i>	(Hopper <i>et al.</i> , 1980)
<i>xpo1-1</i>	MSY100	<i>MATα xpo1::LEU2 +pKW457 (xpo1-1 HIS3) ura3-1 trp1-1 leu2 ade2-1 can1-1</i>	(Stade <i>et al.</i> , 1997a)
<i>mex67-5</i>	MSY176	<i>MATa mex67::HIS3 +(pRS314 mex67-5 TRP) ura3 trp1 leu2 ade2 his3</i>	(Segref <i>et al.</i> , 1997)
<i>mtr2-9</i>	MSY177	<i>MATa mtr2::HIS3 +(pRS315 mtr2-9 LEU) ura3 trp1 leu2 ade2 his3</i>	(Santos-Rosa <i>et al.</i> , 1998)

2.1.7.2 Bakterienstämme

Tabelle 2.7 Genotypen der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	<i>F deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) supE44-1 thi-1 gyrA96 relA1</i>
GM 2163	<i>F ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>
TOP10F'	<i>F' {lacI^f Tn10 (Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>

2.1.8 Medien

• Bakterien-Medien

Für Standard-Bakterienkulturen wurde LB-Medium (1%(w/v) Trypton; 0,5%(w/v) Hefeextrakt; 0,5%(w/v) NaCl) mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin verwendet. LB-Platten enthielten zusätzlich 1,6%(w/v) Agar.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde SOB-Medium (2%(w/v) Pepton; 0,5%(w/v) Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl) verwendet.

• Hefe-Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Hefen ohne Plasmide in YPD-Medium (1%(w/v) Hefeextrakt, 2%(w/v) Pepton, 2%(w/v) Glucose) angezogen. Zur Selektion auf genetische Marker oder Plasmide wurden geeignete HC-Medien verwendet (Adams *et al.*, 1997).

2.1.9 Stammlösungen

Tabelle 2.9 verwendete Stammlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x PBS	27mM KCl 17mM KH ₂ PO ₄ 1,3M NaCl 100mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
Extraktions-Puffer	100mM Kaliumacetat 20mM Hepes-KOH pH7,4 5mM Magnesiumacetat 1mM EDTA 2mM DTT 0,2 mM PMSF Complete Protease Inhibitor Mix (Roche, Mannheim)
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	14,4%(w/v) Glycin 3%(w/v) Tris Base 1%(w/v) SDS
5x SDS-Probenpuffer	330mM Tris-HCl, pH 6,8 2%(v/v) β-Mercaptoethanol oder 100mM DTT 2%(w/v) SDS 0,1%(w/v) Bromphenolblau 10%(w/v) Glycerin
1x HU-Puffer	8M Harnstoff 5% SDS 200mM Tris-HCl pH6.8 1mM EDTA 4% β-Mercaptoethanol 0.025% Bromphenolblau
10x DNA-Probenpuffer	0,1% Bromphenolblau 50% Glycerin
10x TBE-Puffer	1M Borsäure 1M Tris-Base 10mM EDTA
RNA-Auftragspuffer	1xMOPS-Puffer 7%(w/v) Formaldehyd 50% Formamid
10x MOPS-Puffer	200mM MOPS pH7,0 50mM Natriumacetat 10mM EDTA
20x SSC	3M Natriumchlorid 0,3M Natriumcitrat pH7,0

Sonstige verwendete Lösungen sind im Abschnitt Methoden erwähnt. Alle Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt. Falls notwendig wurden die Lösungen durch Autoklavieren für 20min bei 121°C oder durch Filtration (Sterilfilter 0,2µm Porendurchmesser; Schleicher&Schuell, Dassel) sterilisiert.

2.1.10 Kits

QIAprep[®] Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden)
QIAquick[®] Gel Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden)
QIAquick[®] PCR Aufreinigungs-Kit (Qiagen, Hilden)
Nucleobond AX Plasmid-Präparations-Kit (Machery-Nagel, Düren)
ECL Western-Blot Detektions-Kit (Roche, Mannheim)
peqGOLD RNAPure[™] RNA-Extraktions-Kit (Pepqlab Biotechnologie, Erlangen)
Prime-It[®] II Random Primer Labelling Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
JETstar MIDI/MAXI Kit (Genomed, Bad Oeynhausen)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden entweder direkt aus bereits vorhandenen Plasmiden herausgeschnitten oder durch PCR von Plasmid-DNA oder einer genomischen Hefe-Bibliothek amplifiziert. Im Falle eines PCR-Schrittes wurden die PCR-Produkte zunächst in einen TOPO-Vektor (TOPO TA Cloning® Kit) subkloniert, anschließend mittels der an den Enden durch Primer-Mutagenese eingeführten Restriktions-Schnittstellen aus dem TOPO-Vektor ausgeschnitten und in den Ziel-Vektor kloniert.

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Verwendung in Klonierungen wurden DNA-Fragmente mittels PCR mit einer Kombination aus Taq-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) und Pfu-Turbo®-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) amplifiziert.

Eine typische Reaktion enthielt in 100µl

Puffer	1xTaq-Puffer
Primer	je 1µM
dNTPs	je 0,25mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Template	5ng Plasmid-DNA oder 500ng genomische Hefe-Bibliothek
Polymerasen	1U Taq-DNA-Polymerase 2,5U Pfu-Turbo®-DNA-Polymerase

Die PCR-Apparatur wurde wie folgt programmiert:

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	94°C	1min
2	Denaturierung	94°C	30sek
3	Primer-Anlagerung	50-60°C	30sek
4	Elongation	72°C	1-4min
5	finale Elongation	72°C	3-7min
6	Konservierung	4°C	unbegrenzt

Die Schritte 2-4 wurden je nach Häufigkeit der Ziel-DNA 20-35 Mal wiederholt.

2.2.1.2 Präparativer Restriktionsverdau und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Alle präparativen Restriktionsverdaus wurden in den mitgelieferten Puffern der Hersteller mit 2-3-fachem Überverdau durchgeführt. Für jeden einzelnen Verdau wurden die nötige Enzymmenge (ohne Überverdau) nach folgender Formel berechnet:

$$E [U] = \frac{N(S)}{kb(S)} \times \frac{kb(R)}{N(R)} \times n(S)$$

E [U]	= benötigte Enzymmenge in Units
N(S)	= Anzahl der Schnittstellen in der Substrat-DNA
kb(S)	= Länge der Substrat-DNA (in kb)
kb(R)	= Länge der Referenz-DNA des Herstellers (in kb)
N(R)	= Anzahl der Schnittstellen in der Referenz-DNA
n(S)	= Menge der zu schneidenden DNA in µg

Zur Aufreinigung von Fragmenten wurde geschnittene DNA aus einem TBE-Agarosegel (Sambrook *et al.*, 1989) mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraktions-Kits nach Angaben des Herstellers extrahiert.

2.2.1.3 Klonierung mit komplementären Oligonukleotiden

Zu klonierende DNA-Fragmente bis etwa 70nt Länge wurden durch Aneinanderlagerung zweier teilkomplementärer Oligonukleotide erzeugt. Die Oligonukleotide wurden derart konstruiert, dass nach ihrer Anlagerung neben einem komplementären Kernbereich kohäsive Enden entstanden, die direkt ohne Restriktionsverdau mit den entsprechenden kohäsiven Enden des vorgeschrittenen Vektors basenpaaren konnten.

Zur Anlagerung wurden beide Oligonukleotide in einer Konzentration von je 1µM in TE verdünnt und die Lösung für 2min im Heizblock auf 94°C erhitzt. Durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur im ausgeschalteten Heizblock wurde die komplementäre Anlagerung beider Oligonukleotide begünstigt. Zur Ligation wurden 0,1 bis 8µl der Lösung eingesetzt.

2.2.1.4 Ligation

Die zu ligierenden aufgereinigten Fragmente wurden durch Vergleich mit bekannten DNA-Mengen auf einem EtBr-Agarose-Gel quantifiziert. Eine typische Ligationsreaktion enthielt in 10µl Volumen je 30fmol jedes DNA-Fragments, 80U T4-DNA-Ligase (NEB, Beverly, MA, USA) sowie 1xT4-DNA-Ligase-Puffer. Vor der Zugabe von Ligase und Puffer wurden die übrigen Komponenten 5min bei 45°C erhitzt und im Eisbad abgekühlt. Die Ligation erfolgte bei 16°C für 16 Stunden oder bei 25°C für eine Stunde. Zur Entsalzung der Ligationsreaktionen wurde das gesamte Reaktionsvolumen für 30-120min auf einer auf Wasser schwimmende Nitrozellulose-Membran (0,025µm Porengröße; Millipore, USA) inkubiert.

2.2.1.5 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Der zu bearbeitende *Escherichia coli*-Stamm wurde in SOB angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden im Eisbad für 10min abgekühlt und durch 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000g geerntet. Das Pellet wurde 2-3 Mal vorsichtig in kaltem sterilem 1,4%(w/v) Glycerin gewaschen bis die Zeitkonstante bei einer Standard-Transformation (2,5kV; 200Ω; 25µF) 4,6 bis 4,8 betrug. Das Pellet wurde in 2-3 Pelletvolumen kaltem sterilem 15%(w/v) Glycerin resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Höchstens 10ng entsalzte DNA in 0,5 bis 1µl wurden mit 40µl auf Eis aufgetauten, elektrokompenten Zellen gemischt und in einer vorgekühlten Elektroporationskuvette bei 2,5kV, 200Ω, 25µF und einer Zeitkonstante von mindestens 4,6 elektroporiert. Die Zellsuspension wurde in 500µl LB ohne Antibiotikum für 90min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. 5-250µl wurden auf selektiven Platten ausplattiert.

2.2.1.6 Klonierungs-Kontrolle durch Kolonie-PCR

Der Klonierungserfolg wurde durch Kolonie-PCR überprüft: Einzelne *E.coli*-Kolonien wurden mit einer gelben 200µl-Spitze in je 25µl LB mit 100µg/ml Ampicillin übertragen. Von dieser Suspension wurde 1µl als Template in einer 25µl-PCR-Reaktion eingesetzt. Eine Standard-PCR-Reaktion enthielt in 25µl Gesamtvolumen:

1µl	Zellsuspension
2,5µl	10x PCR-Puffer
2,5µl	dNTP-Gemisch (je 2,5mM)
0,5µl	Primer 1
0,5µl	Primer 2
0,5µl	Taq-Polymerase (Roche, Mannheim)
17,5µl	Wasser

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt, wobei Anlagerungs-Temperatur und Elongationszeit je nach verwendeten Primern und zu erwartender Produktgröße variiert wurden:

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Zellaufschluss	94°C	5min
2	Denaturierung	94°C	30sek
3	Primer-Anlagerung	50-60°C	30sek
4	Elongation	72°C	1-2min (1min/kb)
5	finale Elongation	72°C	3-7min

Die Schritte 2 - 4 wurden 20-25 Mal wiederholt. 10-25µl der Reaktion wurden auf einem geeigneten Agarose-Gel analysiert.

2.2.1.7 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolation kleiner Mengen (<20µg) von Plasmid-DNA wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Isolation größerer Mengen DNA (20-500µg) von Plasmid-DNA kamen der Nucleobond AX Kit (Machery-Nagel, Düren) oder der JETstar MIDI/MAXI Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Angaben des Herstellers zum Einsatz. Isolierte Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst, ihre Konzentration photometrisch bestimmt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Hefe-spezifische Methoden

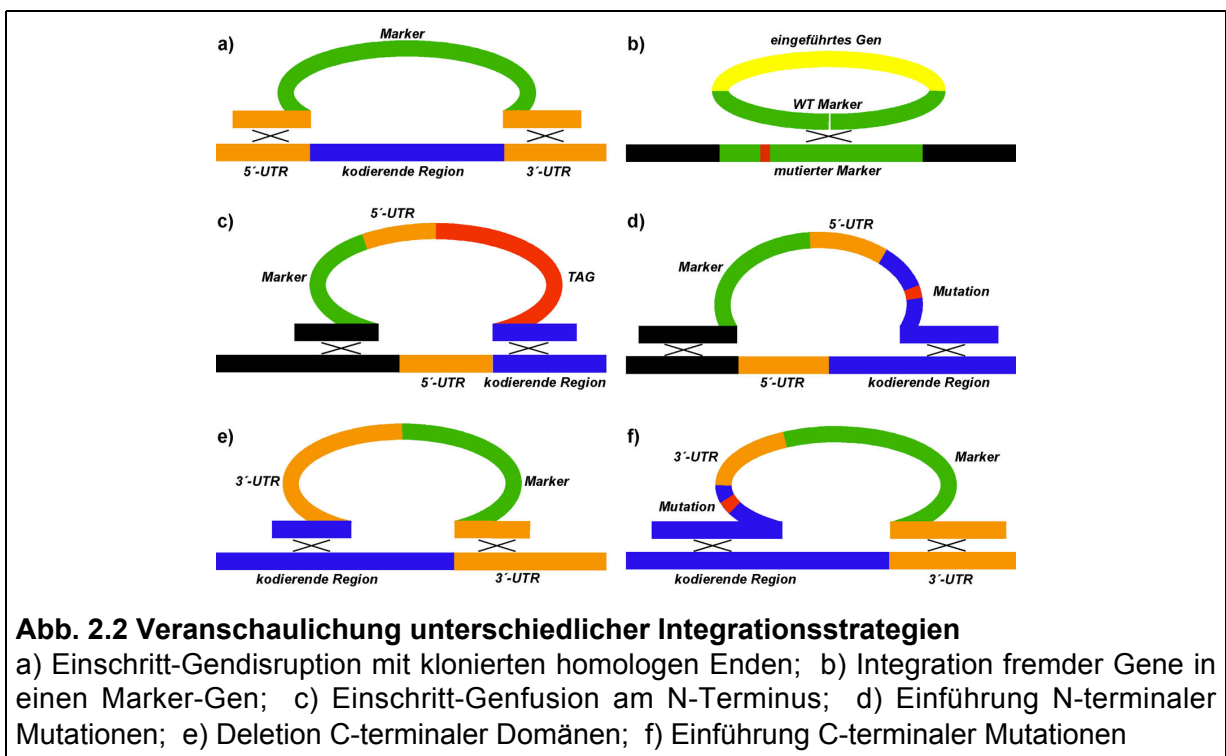
2.2.2.1 hocheffiziente Transformation

Alle Hefe-Transformationen wurden nach (Gietz *et al.*, 1992) durchgeführt.

2.2.2.2 genomische Veränderungen in Hefe

• Integration klonierter DNA-Fragmente

Neben bereits beschriebener Methoden zur Konstruktion N- und C-terminaler Genfusionen durch Zweischritt-Genaustausch (Guthrie & Fink, 1991) und C-terminale Integration (Kahana *et al.*, 1995) wurden genetische Veränderungen durch homologe Rekombination *in vivo* mit den in Abb. 2.2 dargestellten Integrationsstrategien durchgeführt.



Etwa 1µg des relevanten DNA-Fragments wurde durch Restriktionsverdau und Gelextraktion isoliert und in den Zielstamm transformiert. Korrekte Integrationen wurden durch Kolonie-PCR, Western-Blot oder Sequenzierung der betreffenden genomischen Region verifiziert.

• Deletion von Genen durch PCR-generierte DNA-Fragmente

PCR-basierte Gen-Disruption wurde nach (Baudin *et al.*, 1993) mit Sikorski-Vektoren als Template durchgeführt. Etwa 1µg des PCR-Fragments wurde in den Zielstamm transformiert und korrekte Integrationsereignisse durch Kolonie-PCR oder Western-Blot verifiziert.

2.2.2.3 Hefe-Kolonie-PCR

Die zu analysierenden Hefe-Stämme wurden auf YPD-Platten dicht ausgestrichen und 12-36 Stunden bei 30°C inkubiert. Etwa 2µl Zellvolumen wurden in 100µl 20mM Tris-HCl pH10,4 resuspendiert und davon 1µl als Template in einer 25µl Standard-PCR-Reaktion (vgl. Abschnitt 2.2.1.6) eingesetzt.

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt, wobei Anlagerungs-Temperatur und Elongationszeit je nach verwendeten Primern und zu erwartender Produktgröße variiert wurden:

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Zellaufschluss	94°C	15min
2	Denaturierung	94°C	45sek
3	Primer-Anlagerung	50-60°C	45sek
4	Elongation	72°C	1-3min (1min/kb)
5	finale Elongation	72°C	3-7min

Die Schritte 2-4 wurden 35 Mal wiederholt. 10-25µl der Reaktion wurden auf einem geeigneten Agarose-Gel analysiert.

2.2.2.4 Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts durch FACS

2 OD₆₀₀ logarithmisch wachsender Hefezellen wurden abzentrifugiert, zwei Mal mit 50mM Tris-HCl pH8,0 gewaschen, in 1ml 50mM Tris-HCl pH8,0, 70% Ethanol resuspendiert und über Nacht bei 4°C auf einem Rad inkubiert. Am nächsten Morgen wurden von der Zellsuspension 100µl abzentrifugiert, zwei Mal mit 1ml 50mM Tris-HCl pH8,0 gewaschen, in 0,5ml 2mg/ml hitzebehandelte RNaseA in 50mM Tris-HCl pH8,0 resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jede Probe wurden mit 20µl 20mg/ml Proteinase K versetzt, 30-60min bei 37°C verdaut, abzentrifugiert und mit 1ml FACS-Puffer (200mM Tris-HCl pH7,5; 211mM NaCl; 78mM MgCl₂) gewaschen. Die Zellen wurden in 500µl FACS-PI (180mM Tris-HCl pH7,5; 190mM NaCl; 70mM MgCl₂; 50µg/ml Propidiumiodid) aufgenommen und im Dunkeln 30-120min inkubiert. Um eventuell vorhandene Zellklumpen zu trennen, wurden die Proben unmittelbar vor der Messung für 2-3min im Ultraschallbad behandelt. 25-50µl der Probe wurden in 1ml 50mM Tris-HCl pH8,0 resuspendiert und mit folgenden Einstellungen im FL2-Kanal eines FACScan Cytometers (Becton Dickinson Biosciences) analysiert.

Tabelle 2.12 Geräteeinstellungen zur DNA-Bestimmung per FACS

Parameter	Detektor	Spannung	Verstärkung	Modus	Schwellenwert
P1	FSC	EO1	1,36	linear	49
P2	SSC	440	1,00	linear	-
P3	FL1	721	6,39	linear	-
P4	FL2	736	7,21	linear	-
P4	FL3	758	6,72	linear	-
P6	FL3-A		4,82	linear	-
P7	FL3-W		7,46	linear	-

Die Daten wurden mit Cell Quest Pro Version 4.0.1 (Becton Dickinson Biosciences) verarbeitet.

2.2.2.5 Mikroskopie von GFP-Fusionsproteinen

Hefekulturen wurden bei 25°C in geeignetem Medium kultiviert. 1ml logarithmischer Kultur wurde abzentrifugiert und in 30µl HC-Medium resuspendiert. 3µl der Zellsuspension wurden mikroskopiert. Die Dokumentation erfolgt an einem Olympus BX60 Mikroskop mit CCD Kamera (Hamamatsu ORCA-ER Digital Kamera C4742-95) unter Verwendung eines 100x Plan Apochromat Ölimmersions-Objektivs (Zeiss, Jena) und eines Fluoreszenzfilters. Die Aufzeichnung des Kamerasignal erfolgte unter Verwendung der Software Openlab 3.0.1 (Improvision, Heidelberg).

2.2.2.6 Analyse des Aktin-Zytoskeletts

Zur Analyse des Aktin-Zytoskeletts wurden Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert, in einem Zehntel Volumen frischem vorgewärmten Medium aufgenommen, mit 30µg/ml Latrunculin A (Phil Crews, Universität Kalifornien, Santa Cruz, USA; Stammlösung: 10mg/ml in DMSO) oder 0,3% DMSO versetzt und für weitere 15min bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 3,7% Formaldehyd für eine Stunde fixiert, spheroplastiert und auf mit 0,02% (w/v) Polylysin beschichtete Objektträger überführt. Nach 5min Behandlung mit PBS, 0,1% (w/v) Tween20 und 30min mit PBS, 1% (w/v) BSA wurden die Spheroplasten für 40min in 0,66µM (20U/ml) AlexaTM488-Phalloidin (Molecular Probes) in PBS, 1% BSA, sowie 5min in von 0,1µg/ml 4'-6-Diamido-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) in PBS inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit PBS in 80% Glycerin überschichtet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.2.7 Depletion von Scp160p in *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stämmen

Ein *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stamm und ein isogener *WT*-Stamm wurden in YEP mit 2% Galaktose bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,5 bei 25°C angezogen, in einer Dichte von 0,002 OD₆₀₀ in YPD angeimpft und für 15 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zieldichte nach 15 Stunden war bei beiden Stämmen 1,2-1,4 OD₆₀₀. Zur Korrektur von evtl. geringfügig ungleichem Wachstum wurden die Kulturen bis spätestens 4h vor dem Ernten mit vorgewärmtem YPD auf gleiche Dichte verdünnt.

2.2.3 RNA-spezifische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Hefe

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Hefe wurde der peqGOLD RNAPureTM Kit (PeqLab, Erlangen) verwendet. 50 OD₆₀₀ logarithmisch wachsender Hefezellen wurden in 2ml peqGOLD RNAPureTM resuspendiert und durch 10-minütiges Vortexen mit 500µl Glasbeads aufgeschlossen. Die weitere Verfahrensweise entsprach den Angaben des Herstellers. Die präzipitierte und gewaschene RNA wurde in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 RNA-Präparation aus zytosolischen und membranangereicherten Fraktionen

Zellernte und Aufschluss wurden mit Modifikationen nach (Schultz, 1999) durchgeführt. 2x500ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur (OD₆₀₀=1-1,4) wurden in 2 vorgekühlte 1000ml Kunststoffbecher mit 5ml 10mg/ml Cycloheximid überführt, 5min im Eisbad inkubiert, 5min bei 6000rpm und 4°C in einem FAS10C Rotor abzentrifugiert, in 40ml des kalten Überstands resuspendiert und 2min bei 6000g und 4°C in einem 50ml Polypropylen-Röhrchen pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden mit vorgekühlten Spateln in vorgekühlte 20ml Einmalspritzen überführt und langsam in zur Hälfte mit flüssigem Stickstoff gefüllte 50ml Polypropylen-Röhrchen eingespritzt. Die entstehenden Würste wurden mit einem vorgekühlten Spatel in kleinere Fragmente (Nudeln) zerstoßen. Überschüssiger Stickstoff wurde bei -80°C verdampft, die Nudeln mit auf -80°C vorgekühltem Mörtel und Pistill unter flüssigem Stickstoff zu feinstem Pulver zerrieben und bei -80°C gelagert.

Zur Extraktion wurden je 1,5g des Pulvers in eine Wägeschale mittlerer Größe eingewogen und auf Eis aufgetaut. Bei beginnendem Tauvorgang wurden die Zellen mit 2ml eiskaltem Extraktionspuffer vermischt und 200µl 200mM Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex (Fluka, Taufkirchen) sowie 20µl 20U/µl SUPERase-In (Ambion) direkt zugegeben. Durch Zentrifugation bei 1000g für 5min wurden ein Totallysat erhalten.

Die Fraktionierung von zytosolischen und membrangebundenen Polysomen erfolgte nach (Stoltenburg *et al.*, 1995): Das Totallysat wurde für 8min bei 10000g zentrifugiert. Das membranangereicherte 10000g-Pellet wurde mit 200µl Extraktionspuffer gespült, für 2min bei 25000g zentrifugiert, in 1ml Peq-Gold resuspendiert und bis zur RNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff gelagert. Der 10000g-Überstand wurde 10min bei 25000g zentrifugiert. Zur Reinigung zytosolischer RNA wurde der 25000g-Überstand viermal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, mit 0,8 Volumen Isopropanol präzipitiert, 5min bei 25000g abzentrifugiert, in 300µl DEPC-Wasser aufgenommen und zum Lösen kurz bei 70°C geschüttelt. Zur weiteren Aufreinigung wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand mit 30µl 5M Natriumacetat und 1200µl Ethanol 10min bei –80°C präzipitiert und bei 25000g für 10min zentrifugiert. Die isolierte zytosolische RNA wurde in 500µl DEPC-Wasser aufgenommen und zum Lösen kurz bei 70°C geschüttelt. Zur Isolation der membrangebundenen RNA wurde die in Peq-Gold aufgenommene membranangereicherte Fraktion aufgetaut, mit 300µl Chloroform versetzt, kurz geschüttelt und zur Phasentrennung 5min bei 25000g abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde viermal mit Phenol/Chloroform (1:1, ohne Isoamylalkohol) extrahiert, entsprechend den zytosolischen Fraktionen durch Isopropanol- und Ethanol-Fällungen gereinigt und in 100µl DEPC-Wasser aufgenommen. Zur Analyse der Integrität der RNA wurden je 5µg jeder Fraktion durch Northern-Blot analysiert.

2.2.3.3 Herstellung ³²P-markierter DNA-Sonden für Northern-Blots

³²P-markierte radioaktive Sonden wurden mit dem Prime-It®II Random Primer Labelling-Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Anleitung hergestellt. Statt 25ng wurden jedoch 50-100ng Template-DNA eingesetzt. Als Template dienten geextrahierte DNA-Fragmente, die durch PCR mit folgenden Template/Primer-Kombinationen oder durch Ausschneiden aus einem Plasmid hergestellt wurden:

Tabelle 2.10 Identität der für die Präparation von Northern-Sonden eingesetzten Template-DNA

Gen	Template	Primer1	Primer2	amplifizierter Bereich (nt)
<i>SCP160</i>	YEP13/6	SFSCP6	SFSCP14	1-3666
<i>GPD1</i>	(1)	SFGPD146	SFGPD147	37-1139
<i>SSH1</i>	(1)	SFSSH135	SFSSH123	3-1466
<i>FIT1</i>	(1)	SFFIT1-152	SFFIT1-153	31-1515
<i>FIT2</i>	(1)	SFFIT2-153	SFFIT2-154	9-454
<i>FIT3</i>	(1)	SFFIT3-155	SSFFIT3-156	11-612
<i>ERG11</i>	(1)	SFERG150	SFERG151	7-1563
<i>RPL25</i>	(1)	SFRPL25-164	SFRPL25-165	11-402 ⁽²⁾
<i>GAS5</i>	(1)	SFGAS5-160	SFGAS5-161	40-1435
<i>VPH1</i>	(1)	SFVPH1-162	SFVPH1-163	3-2516
<i>SIM1</i>	2µ <i>URA3 SIM1</i> (Du & Novick, 2002)	1,4kb-BsaAI-Fragment		67-1433
<i>SBP1</i>	(1)	SFSBP1-166	SFSBP1-167	39-877

(1): chromosomale Hefe-Bibliothek (Rose *et al.*, 1987)

(2): Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz der mRNA

Nicht inkorporierte Nukleotide wurden von den radioaktiven Sonden auf MicroSpin™ G-25 Säulchen (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) abgetrennt.

2.2.3.4 Northern-Blot

2,5-20µg Gesamt-RNA wurde auf einem MOPS-Formaldehyd-Gel (1xMOPS-Puffer, 6% Formaldehyd, 1% Agarose) bei 80V aufgetrennt. Die RNA wurde durch Kapillar-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Positive™ Membrane, Q-BioGene) transferiert (Sambrook *et al.*, 1989), diese kurz in 2xSSC gewaschen und abgetrocknet. Die RNA wurde durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stratagene, 2xAuto-Crosslink) kovalent an die Membran gebunden und durch Inkubation in Methylenblau (0,04% Methylenblau, 0,5M Natriumacetat pH5,5) sichtbar gemacht.

Prähybridisierungslösung (46µg/ml hitzedenaturierte Sperma-DNA, 10%(w/v) Dextransulfat 500000, 600mM NaCl, 180mM Na₂HPO₄ pH6,2, 6mM EDTA, 1%(w/v) Natriumlaurylsarcosin) wurde wie folgt hergestellt: 20g Dextransulfat 500000 (Roth, Karlsruhe) wurde in 60ml 20xSCP (2M NaCl, 20mM EDTA, 600mM Na₂HPO₄ pH6,2) gelöst, auf 101ml mit H₂O aufgefüllt und durch Zugabe von 7ml 30% Natriumlaurylsarcosin komplettiert. Zur Herstellung von je 10ml Prähybridisierungslösung wurden 4,6ml Wasser mit 46µl 10mg/ml Sperma-DNA für 7min auf 95°C erhitzt, im Eisbad abgekühlt und mit 5,4ml SCP/Sarc/DS-Mix versetzt. Die Prähybridisierung der Northern-Membranen erfolgte für 2h bei 65°C in Prähybridisierungslösung, die Hybridisierung bei 65°C über Nacht in Prähybridisierungslösung mit 1-3x10⁶cpm/ml hitzedenaturierter radioaktiver Sonde. Die Membran wurden zweimal kurz bei Raumtemperatur mit 2xSSC, 0,1%(w/v) SDS, zweimal für mind. 20min bei 50°C mit 0,5xSSC, 0,1%(w/v) SDS und einmal kurz bei Raumtemperatur in 3mM Tris-HCl pH8,0 gewaschen, in einem Klarsichtbeutel luftdicht feucht verpackt und auf einer Phosphorimagerplatte exponiert. Die Analyse der Signale erfolgte mittels Phosphorimager (Fujix BAS 1000, Fuji) und der Software Fuji MacBAS V2.0. Durch zweimaliges Waschen der Membran bei 95°C für 30min in 0,5% SDS konnte die radioaktive Sonde entfernt und die Membran mit einer weiteren Sonde hybridisiert werden.

2.2.3.5 Analyse des Poly(A)-Schwanzes definierter mRNAs

Die Bestimmung der Länge des Poly(A)-Schwanzes definierter mRNAs wurde durch RACE-PAT wie beschrieben (Salles *et al.*, 1999) durchgeführt. Als Template für die cDNA-Synthese diente je 1µg Gesamt-RNA-Präparation. Die Amplifikation der genspezifischen cDNA-Fragmente erfolgte mit je 1µl des cDNA-Synthese-Ansatzes als Template in einer 25µl-Reaktion, je 5µCi α-³³P-dCTP pro Reaktion, dem Anker(dT)₁₂-Primer sowie je einem der aufgeführten genspezifischen Primern.

Tabelle 2.11 Für RACE-PAT verwendete Primer

Gen	Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
<i>unspezifisch</i>	Anker(dT) ₁₂ -181	GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTTTT
<i>GAS5</i>	SFGAS5-186	CACCCCCTTCTTTACACATTG
<i>VPH1</i>	SFVPH1-170	GCAAGCTCTTCGCTTCAAGC
<i>SIM1</i>	SFSIM1-187	ATCCAAGTGAAGTTGTTAGACGACC
<i>RPL25</i>	SFRPL25-185	CGAAGTTGACGTATTGAAGGTTAACAC
<i>SBP1</i>	SFSBP1-173	GCAAGAACTGGTTCTGAAGAAAAGC

Die nach dem PCR-Schritt erhaltenen ³³P-markierten DNA-Fragmente wurden durch Gelfiltration auf G-25-Säulchen (Pharmacia) gereinigt und auf einem Sequenziergel (5% Polyacrylamid 19:1, 8M Harnstoff) aufgetrennt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Zellaufschluss durch Glasbead-Disruption

Hefezellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 geerntet und in 20µl/OD₆₀₀ kaltem Extraktions-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von zwei Zellvolumen Glasbeads wurden die Zellen bei 4°C für 5min durch Vortexen und heftiges Schütteln aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 800-1200g für 2min bei 4°C pelletiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde als Gesamtextrakt für weitere biochemische Fraktionierungen eingesetzt.

2.2.4.2 Gesamtextrakte durch NaOH-TCA-Lyse

1-5 OD₆₀₀ Hefezellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 150µl 1,85M Natronlauge, 7,5%(v/v) β-Mercaptoethanol resuspendiert. Nach 15min Inkubation auf Eis wurden 150µl 55%(w/v) TCA sowie 1ml kaltes Wasser hinzugefügt und die Suspension weitere 10min auf Eis inkubiert. Gefälltes Material wurde bei 14000rpm, 4°C für 10min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet nochmals kurz zentrifugiert und alle Flüssigkeits-Reste abgenommen. Das Pellet wurde in 50-100µl HU-Puffer resuspendiert und die Proteine durch Erhitzen für 10min auf 37°C oder 50°C solubilisiert. Falls nötig wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1-3µl 2M Tris-Base reguliert. Ein Aliquot entsprechend 0,1-0,4 OD₆₀₀ Zellen wurde durch Western-Blot analysiert.

2.2.4.3 Konzentration von Proteinen durch TCA-Fällung

Proteinhaltige Lösungen wurden mit einem gleichem Volumen 20-30% TCA versetzt, bei 4°C für 60min gefällt und bei 13000g, 4°C für 10min pelletiert. Das Protein-Pellet wurde 1-2 Mal mit 80% Aceton, 20mM Tris-Base gewaschen, für 5min bei Raumtemperatur getrocknet und in HU-Puffer oder Standard-SDS-Probenpuffer aufgenommen. Falls die zu fällenden Proben Detergentien enthielten, wurde statt mit 20-30% TCA mit einem gleichen Volumen 20% TCA in Aceton gefällt.

2.2.4.4 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Nach Glasbead-Aufschluss erhaltenes Totallysat wurde für 20min bei 4°C, 6000g zentrifugiert. Das Pellet (P6) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, der Überstand wurde bei für 20min bei 4°C, 18000g zentrifugiert. Das resultierende Pellet (P18) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, der Überstand wurde bei für 20min bei 4°C und 200000g zentrifugiert. Das Pellet (P200) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und der Überstand (S200) mit TCA gefällt.

Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurden alle Pellets in gleichem Volumen 1xSDS-Probenpuffer gelöst und ein Aliquot entsprechend 0,2-1OD₆₀₀ auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.2.4.5 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

4ml- oder 12ml-Saccharose-Dichtegradienten wurden mit Hilfe eines Gradient Master (Nycomed) aus Saccharose-Stammlösungen in Extraktionspuffer hergestellt. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten mit Hilfe eines Dichtegradienten-Fraktionators (ISCO, Modell 640) von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 10) in 10 Fraktionen fraktioniert. Während der Fraktionierung wurde das Absorptionsprofil bei 254nm aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden mit TCA gefällt und durch Western-Blot analysiert.

2.2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Solubilisierung und Denaturierung wurden die Proben nach Zugabe eines Probenpuffers für 5-15min bei 37°C, 50°C oder 95°C inkubiert. Dabei kamen unterschiedliche Probenpuffer zum Einsatz: SDS-Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol oder DTT sowie HU-Puffer. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde wie beschrieben durchgeführt (Laemmli, 1970). Wenn nicht anders angegeben, wurden 6-18%ige Gradientengele verwendet.

2.2.4.7 Western-Blot

SDS-PAGE-Gele wurden durch halbtrockenen Transfer (Kyhse-Andersen, 1984) auf Nitrocellulose-Membranen (Protran® BA85, Porengröße 0,45µm, Schleicher&Schuell, Dassel) übertragen.

Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

- Anode
- 6 Whatmann-Papiere getränkt in Anodenpuffer I (300mM Tris-Base, 10%(v/v) Methanol)
- Whatmann-Papiere getränkt in Anodenpuffer II (25mM Tris-Base, 10%(v/v) Methanol)
- Nitrocellulose-Membran, befeuchtet mit Anodenpuffer II
- SDS-Polyacrylamidgel
- Whatmann-Papiere getränkt in Kathodenpuffer (25mM Tris-Base, 40mM 6-Aminohexansäure, 10%(v/v) Methanol)
- Kathode

Der Transfer erfolgte für 14h bei 5-10V.

2.2.4.8 Immunodetektion von Proteinen nach Western-Blot

Die Detektion von Proteinen wurde wie beschrieben (Towbin *et al.*, 1979) durchgeführt: Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mind. 30min in Blockierungs-Puffer (1xPBS, 5%(w/v) Magermilchpulver; 0,5%(v/v) Tween-20) abgesättigt und für mind. 90min mit Primär-Antikörper in Blockierungspuffer sowie 15min mit peroxidasegekoppeltem Sekundär-Antikörper in Blockierungspuffer bei RT inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurde die Membran jeweils zweimal kurz und zweimal 5min in PBS gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte durch Enhanced Chemoluminescence (ECL) nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim). Für die Detektion der ECL-Signale wurden Kodak BioMax MR Filme verwendet.

2.2.5 Auswertung von Mikroarray-Experimenten

Die genomweite Analyse von mRNA-Häufigkeiten wurde von PD Dr. Thomas Preiss am EMBL Heidelberg durchgeführt. Die verwendeten Mikroarrays basieren auf einer modifizierten Glasoberfläche, auf der für jede mRNA durch PCR amplifizierte cDNA in je zwei Messpunkten gekoppelt ist. Zusätzliche Messpunkte dienen der Datennormierung durch definiert zugegebene RNA. RNA-Präparationen aus WT- und Scp160p-depletierten Stämmen wurden in Gegenwart von chemisch modifizierbaren Desoxynukleotiden mit Oligo(dT)₂₀-Primern revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mit Cy3 bzw. Cy5 kovalent modifiziert und aufgereinigt. Entsprechend dem Experiment wurden unterschiedlich markierte cDNA-Präparationen auf ein Mikroarray hybridisiert, gewaschen und die Fluoreszenzsignale für jeden Messpunkt bei 532nm (Cy3-Kanal) und 635nm (Cy5-Kanal) mit einem Scanner (GenePix 4000B, Axon Instruments, Union City, CA, USA) ausgelesen. Die Daten wurden mit einer speziellen Software (GenePix Pro 4.0.0.54, Axon Instruments, Union City, CA, USA) weiterbearbeitet.

2.2.5.1 Einfluss von Scp160p auf das Hefe-Transkriptom

Zur Analyse der Änderungen im Transkriptom nach Scp160p-Depletion wurde die Häufigkeit jeder mRNA in zwei unabhängigen Experimenten auf Mikroarrays analysiert. Die Daten jedes einzelnen Experiments setzten sich aus je zwei Mikroarrays mit unterschiedlich markierter cDNA (Cy3/Cy5 und Cy5/Cy3) sowie je 2 unabhängigen Messpunkten pro Mikroarray zusammen.

Zur Analyse standen für jedes biologische Experiment durch die Mikroarray-Software GenePix Pro gelieferte **Regulationsquotienten** zur Verfügung. Diese Werte repräsentieren die relative Häufigkeit einer mRNA im Scp160p-depletierten Stamm im Vergleich zum WT-Stamm und sind das Resultat der Auswertung zweier Mikroarrays mit unterschiedlich markierter cDNA und jeweils zwei Messpunkten (vier Messpunkte gesamt). Daneben konnte auf

die hintergrundbereinigten Intensitäten im Cy3- oder Cy5-Kanal jedes einzelnen Mikroarrays zugegriffen werden. Die weitere Auswertung wurde mit Excel 98 (Microsoft) durchgeführt. Die hintergrundbereinigten Intensitätsdaten für beide Messpunkte derselben mRNA auf einem Array wurden gemittelt und die Gesamtintensitäten der einzelnen Kanäle (Cy3: 532nm und Cy5: 635nm) auf allen Arrays auf den gemeinsamen Wert 2×10^7 normiert. Die so von zwei unabhängige Experimente mit je zwei unterschiedlich markierten cDNA-Präparationen erhaltenen Intensitätsdaten wurden für den *WT*- und *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stamm zusammengestellt und gemittelt. Durch logarithmische Auftragung der errechneten normalisierten mittleren Gesamtintensitäten für jedes einzelne Gen im *WT*-Stamm (x-Achse) und *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stamm (y-Achse) wurde ein **Scatter-Blot** erhalten, der das Maß der Abweichung zwischen *WT*- und Scp160p-depletierem Stamm erkennen lässt. Zur Ermittlung der **Verteilung der Regulationsquotienten** aller mRNAs wurden die Regulationsquotienten für jedes unabhängige Experiment (bestehend aus zwei Mikroarrays mit jeweils unterschiedlich markierter cDNA) gemittelt. Die so erhaltenen gemittelten Regulationsquotienten wurden in 201 Gruppen eingeteilt, die in einer logarithmischen Darstellung einen Regulationsbereich von 0,1 bis 10 (10-fache Reduktion bis 10-fache Induktion) äquidistant abdecken. Durch Auftragung der Anzahl von mRNAs in einer Gruppe (y-Achse) gegen den das Intervall (x-Achse) wurde eine Häufigkeitsverteilung erhalten.

Zur Untersuchung der Frage, ob sich die Häufigkeit einer mRNA im Scp160p-depletierten Stamm von der im *WT*-Stamm unterscheidet, wurden die logarithmierten Regulationsquotienten für unabhängige Experimente einer Kombination aus **Schwellenwert- und Signifikanzanalyse** unterzogen: Unter Voraussetzung der Annahme, dass durch die Depletion von Scp160p die Häufigkeit nur weniger mRNAs geändert wird, kann die Gesamtverteilung der Regulationsquotienten der experimentellen Streuung annähernd gleichgesetzt werden. Anhand eines einseitigen Students-t-Test unter Annahme ungleicher Varianzen wurde analysiert, ob die in beiden unabhängigen Experimenten für jede individuelle mRNA erhaltenen logarithmierten Regulationsquotienten in Anbetracht ihrer Mittelwerte und ihrer Standardabweichung statistisch signifikant von der Gesamtverteilung aller erhaltenen mittleren Regulationsquotienten abweichen. Der erhaltene p-Wert repräsentiert die Wahrscheinlichkeit, dass der Mittelwert der Regulationsquotienten einer individuellen mRNA Bestandteil der Gauß-Verteilung aller Regulationsquotienten ist und damit aufgrund einer zufälligen experimentellen Abweichung von 1,0 abweicht (falschpositive Selektion).

mRNAs wurden als geändert selektiert, wenn die Änderung der mittleren mRNA-Häufigkeit zwischen Scp160p-depletierem und *WT*-Stamm 1,5-fach übersteigt und der durch die Signifikanzanalyse erhaltene p-Wert unter 0,10 liegt. Außerdem wurden mRNAs selektiert, wenn die Änderung ihrer mittleren mRNA-Häufigkeit 2-fach übersteigt und der durch die Signifikanzanalyse erhaltene p-Wert unter 0,15 liegt.

Die selektierten mRNAs wurden anhand von MIPS-Datenbanken (Mewes *et al.*, 2002a; b) und der SGD (Cherry, 2002) in Gruppen bezüglich der Lokalisation der von ihnen kodierten Proteine eingeteilt. Um einen Anhaltspunkt für die *relative* Häufigkeit selektierter mRNAs/Proteine im Vergleich zu allen Genen zu erhalten, wurde der Anteil der selektierten und annotierten (eingeteilten) mRNAs/Proteine von der Gesamtheit der in einer Lokalisationsgruppe eingeteilten Proteine berechnet. Bei mRNAs/Proteinen, die in mehr als einer Lokalisationsgruppe auftreten, wurden die einzelnen Lokalisationen unabhängig voneinander gewertet. Unter der Annahme einer repräsentativen Auswahl eingeteilter Gene von der Gesamtheit aller Gene lässt der Vergleich der erhaltenen Daten Aussagen über eine Über- oder Unterrepräsentation spezifischer Lokalisationen in der Gruppe selektierter ORFs im Vergleich zur Gesamtheit aller eingeteilten ORFs zu.

2.2.5.2 Einfluss von Scp160p auf mRNAs in P10 und S25

In zwei unabhängigen Experimenten wurde Gesamt-RNA aus einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion eines Scp160p-depletierten Stammes und eines *WT*-Stammes isoliert und aus gleichen absoluten RNA-Mengen Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNAs hergestellt. Um durch die Fluoreszenzfarbe bedingte Effekte auszuschließen, wurden die Fluoreszenzfarben in den beiden unabhängigen Experimenten jeweils unterschiedlichen Fraktionen zugeordnet. Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markierte cDNA-Präparationen aus beiden Fraktionen des gleichen Stammes wurden auf jeweils einem Mikroarray analysiert.

Die Bearbeitung der aus GenePix Pro gelieferten Rohdaten wurde mit Excel98 (Microsoft) durchgeführt. Für jeden Fluoreszenz-Wellenlänge wurde aus den doppelten Messungen einer mRNA auf einem Mikroarray ein mittlerer Intensitätswert berechnet und die Gesamtintensitäten aller mRNA-Messpunkte auf einem Mikroarray für jede Fluoreszenzwellenlänge getrennt auf den gemeinsamen Wert 2×10^7 normiert. Unabhängig von der verwendeten Fluoreszenzmarkierung wurde für jedes unabhängige Experiment das Verhältnis der mittleren normierten Messpunktintensitäten in der membranangereicherten Fraktion und in der zytosolischen Fraktion (**Membrananreicherung**) im *WT*-Stamm und im Scp160p-depletierten Stamm bestimmt. Aufgrund dieser Berechnungen standen jeweils zwei Membrananreicherungen für *WT*- und Scp160p-depletierten Stamm zur Verfügung. Anhand eines einseitigen t-Tests unter Annahme ungleicher Varianzen wurde ein p-Wert erhalten, der ein Maß für die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Abweichungen zwischen den Mittelwerten beider unabhängigen Experimente im *WT*-Stamm und im Scp160p-depletierten Stamm durch zufällige Streuung der einzelnen Messwerte zustande kommen. Zusätzlich wurde aus den mittleren Membrananreicherungen in beiden unabhängigen Experimenten im *WT*-Stamm und im Scp160p-depletierten Stamm ein **Verschiebungsquotient** (mittlere Membrananreicherungen Scp160p-depletiert / *WT*) berechnet. Ein mRNA-Signal wurde dann als nach Scp160p-Depletion verändert selektiert, wenn der aus dem t-Test erhaltene P-Wert weniger als 0,10 beträgt und sich gleichzeitig nach Scp160p-Depletion die Membrananreicherung für diese mRNA um mindestens einen Faktor 1,5 ändert. Selektierte mRNAs wurden mit Informationen aus den im Internet zugänglichen Datenbanken SGD (Cherry, 2002) und MIPS (Mewes *et al.*, 2002a; b) verknüpft. Falls möglich wurde bei mRNAs, zu denen in beiden Datenbanken keine Informationen bezüglich der Lokalisation der kodierten Proteine zugänglich waren, aufgrund der Anzahl kodierter TM-Domänen (>3 vorhergesagte TM-Domänen) und/oder einer bekannten Funktion und/oder einer ausgeprägten Homologie zu bekannten Proteinen eine grobe Einteilung in Lokalisations-Klassen vorgenommen und der Anteil der mRNAs in einer Klasse von der Gesamtheit aller eingeteilten mRNAs bestimmt. Um zu untersuchen, ob die spezifische Verteilung einer Subpopulation von mRNAs auf einzelne Gruppen von der Verteilung aller analysierbaren mRNAs abweicht, wurde das Verhältnis aus der relativen Häufigkeit einer Gruppe innerhalb der Subpopulation und der relativen Häufigkeit der entsprechenden Gruppe in der Gesamtheit aller analysierbaren mRNAs bestimmt. Das so erhaltene **Repräsentationsverhältnis** zeigt an, um welchen Faktor ein experimentell erhaltener Wert von dem Wert abweicht, der zu erwarten gewesen wäre, wenn die Subpopulation sich wie die Gesamtheit aller Elemente verhalten hätte.

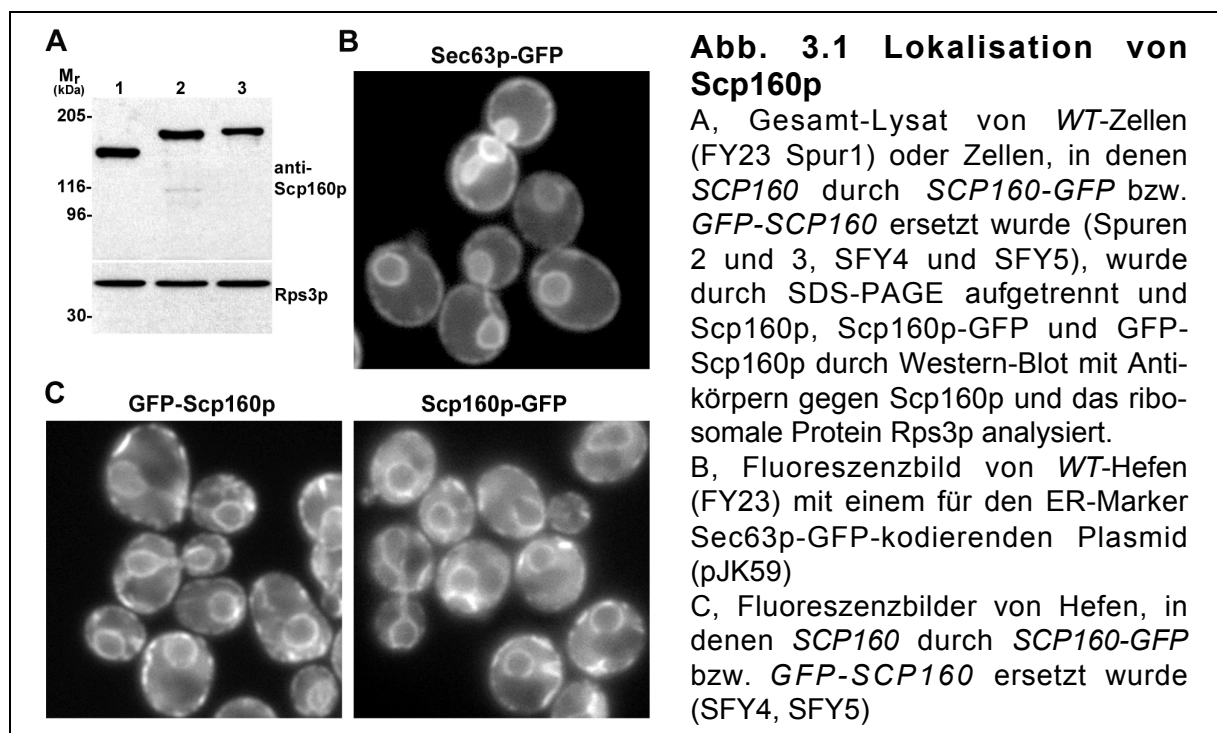
3 ERGEBNISSE

3.1 Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Scp160p

3.1.1 Lokalisation von Scp160p

Als erster Schritt zur Charakterisierung von Scp160p wurde die Lokalisation von GFP-markiertem Scp160p nach Expression unter Kontrolle des eigenen Promotors durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden Konstrukte erstellt, die für N- oder C-terminale Fusionen von Scp160p mit einer fluoreszenzoptimierten GFP-Variante (S65T, V163A) (Kahana & Silver, 1996) kodieren. Diese Konstrukte wurden so ins Genom haploider Hefen eingebracht, dass das *WT-SCP160*-Allel durch das entsprechende GFP-Fusionskonstrukt ersetzt wurde.

Ein Western-Blot (Abb. 3.1 A) zeigt, dass sowohl C- als auch N-terminale Fusionen von Scp160p mit GFP zu Fusionsproteinen der erwarteten Größe führen (Spuren 2 und 3). Die GFP-Fusionsproteine ersetzen das endogene Scp160p (Spur 1). Das jeweils eingeführte GFP-Fusionskonstrukt ist daher das einzige exprimierte *SCP160*-Allel in der Zelle. Sowohl Scp160p-GFP als auch GFP-Scp160p liegen in vergleichbaren Mengen wie das nichtfusionierte *WT*-Protein vor (Abb. 3.1 A). Beide GFP-fusionierten *SCP160*-Konstrukte komplementieren den Verlust des *WT*-Allels bezüglich Zellvolumens und zellulärem DNA-Gehalt (nicht gezeigt). Sowohl GFP-*SCP160* als auch *SCP160*-GFP können daher bezüglich dieser Phänotypen als funktionell betrachtet werden.



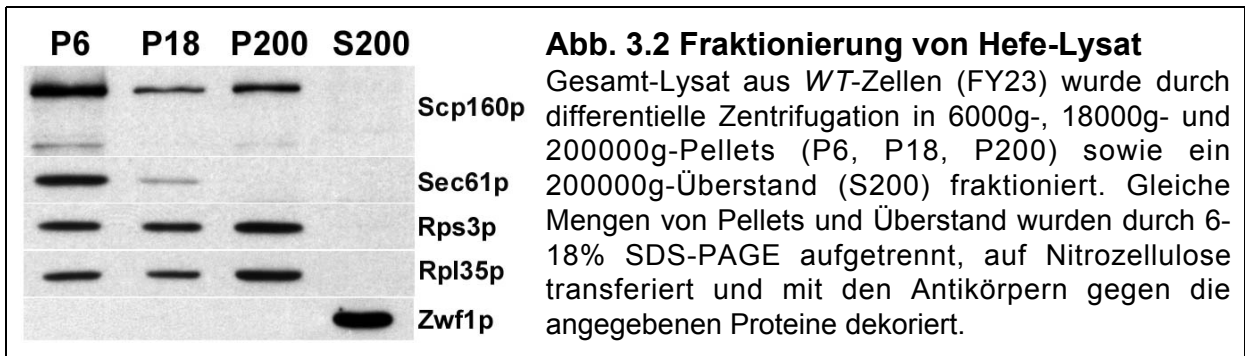
Fluoreszenzbilder von Zellen, die GFP-Scp160p oder Scp160p-GFP exprimieren, zeigt neben schwachen zytoplasmatischen Signalen eine Anreicherung von Fluoreszenzsignal um den Zellkern und in unregelmäßig strukturierten Bereichen in der Zellperipherie (Abb. 3.1 C). Diese Lokalisation ist typisch für das endoplasmatische Retikulum (ER) in Hefe. Dieses besteht aus einem Anteil nahe der Kernmembran (perinukleäres ER) und einem kortikalen Anteil nahe der Plasmamembran. Beide ER-Anteile sind durch tubuläre Strukturen miteinander verbunden (Novick *et al.*, 1980; Preuss *et al.*, 1991; Prinz *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 1989; van Rijn *et al.*, 1975). Um die typische Lokalisation des ER der von Scp160p gegenüberzustellen, wurde ein Hefestamm mit einem Plasmid transformiert, das für ein Fusionsprotein aus GFP und dem integralen ER-Markerprotein Sec63p kodiert (Prinz *et al.*, 2000). Diese Zellen zeigen eine Anreicherung von Fluoreszenzsignal nahe dem Zellkern und in der Zellperipherie. Die Lokalisation von Sec63p-GFP ist somit der von GFP-fusioniertem Scp160p sehr ähnlich. Diese Übereinstimmung zeigt, dass sich der Hauptteil von Scp160p nahe dem ER befindet.

3.1.2 Charakterisierung von Scp160p in einer zytosolischen und einer membranangereicherten Fraktion

Veröffentlichungen anderer Gruppen zeigten, dass sich neben dem ER-nahen Hauptteil von Scp160p ein weiterer Anteil im Zytoplasma befindet (Lang & Fridovich-Keil, 2000; Weber *et al.*, 1997). Beide Gruppen kamen jedoch bezüglich einer Polysomenassoziation dieser Scp160p-Fraktion zu widersprüchlichen Ergebnissen. Zudem wurde der ER-nahe Hauptteil von Scp160p in allen vorangehenden Studien biochemisch nicht näher charakterisiert.

3.1.2.1 Fraktionierung von Hefe-Lysat durch differentielle Zentrifugation

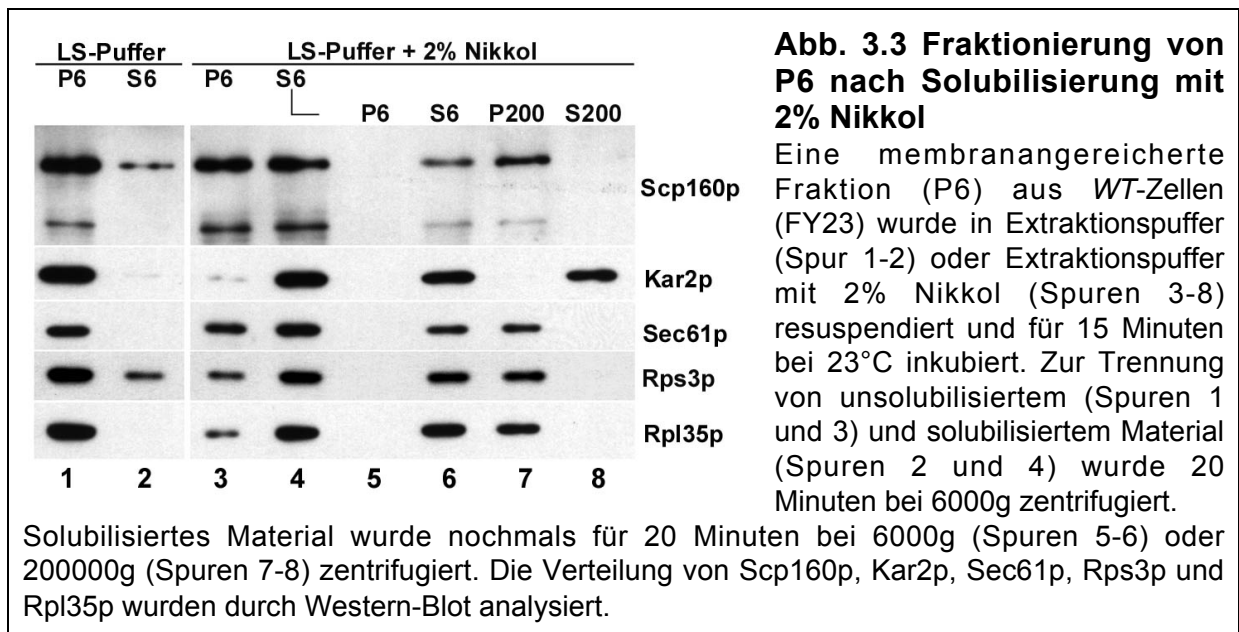
Um die intrazelluläre Verteilung sowie die relativen Mengen von ER-assoziiertem und zytosolischem Scp160p biochemisch zu analysieren, wurden zunächst translatisierende Polysomen durch Behandlung mit Cycloheximid gehemmt. Aus so behandelten Zellen wurde durch Glasbead-Lyse ein Extrakt hergestellt, der weitgehend das gesamte Scp160p enthält (nicht gezeigt). Dieser Extrakt wurde durch differentielle Zentrifugation bei 6000g, 18000g und 200000g in vier Fraktionen (P6, P18, P200 und S200) aufgeteilt und die Verteilung von Scp160p, den ribosomalen Proteinen der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit Rpl35p und Rps3p, dem integralen ER-Membranprotein Sec61p sowie dem zytosolischen Markerprotein Zwf1p (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) durch Western-Blot analysiert.



Das zytosolische Markerprotein Zwf1p befindet sich ausschließlich in S200. Die Hälfte der ribosomalen Proteine Rps3p und Rpl35p verteilt sich auf die Fraktionen P6 und P18, die verbleibende Hälfte befindet sich in P200. Der überwiegende Anteil des integralen ER-Membranproteins Sec61p befindet sich in P6, nur ein kleiner Anteil in P18. Durch die angewandte Fraktionierung werden demzufolge Fraktionen erhalten, in denen ER-Membranen (P6), membranfreie Ribosomen (P200) oder ribosomenfreies Zytosol (S200) angereichert sind. P18 repräsentiert eine Fraktion, in der sich kleine Mengen ER-Membranen sowie Ribosomen befinden. Der Großteil von Scp160p wird in P6, geringere Mengen werden in P18 und P200 nachgewiesen. Scp160p kofraktioniert daher mit ER-Membranen und Ribosomen. Trotz des deutlich geringeren Gehalts an Ribosomen ist Scp160p in der membranhaltigen Fraktion P6 angereichert.

3.1.2.2 Solubilisierung von Scp160p in einer membranangereicherten Fraktion

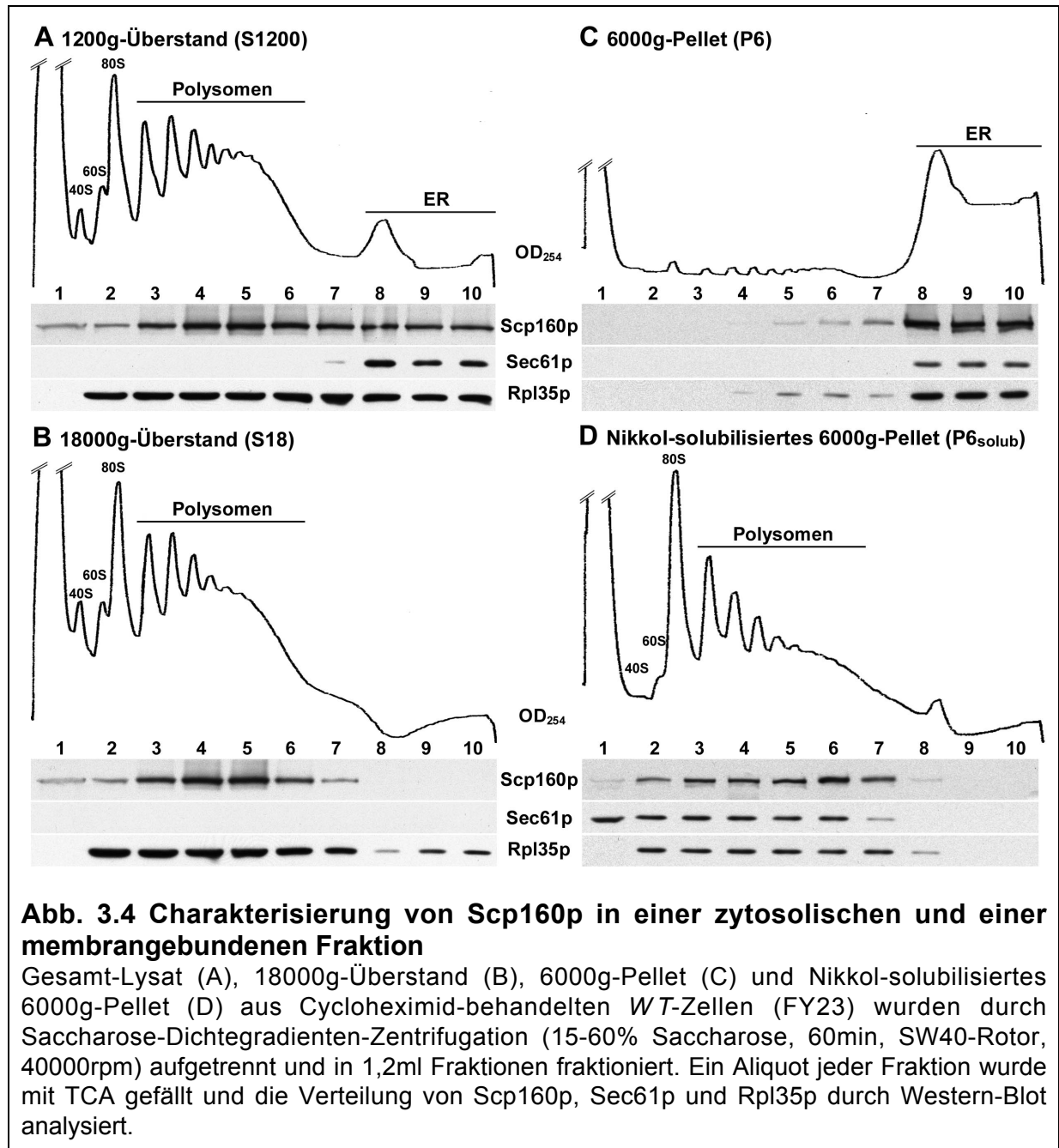
Um zu untersuchen, ob Scp160p in der membranangereicherten Fraktion P6 membranassoziiert vorliegt, wurde in Vorversuchen eine Auswahl mehrerer Detergentien auf ihre Eigenschaften bezüglich der Solubilisierung von Membranmarkern in P6 charakterisiert. Aufgrund der Salzsensitivität von Scp160p (siehe Abb. 3.6 und 3.8) wurde die Solubilisierung unter Niedrigsalz-Bedingungen (100mM Kaliumacetat) durchgeführt. Bezüglich effektiver Freisetzung des luminalen ER-Proteins Kar2p aus der Pelletfraktion, Solubilisierung des ER-Membranproteins Sec61p sowie Integrität von Ribosomen (gleiche Solubilisierung von Rpl35p und Rps3p) erwies sich das milde nichtionische Detergens Nikkol (Oktaethylenglykol-Monododecylether) in einer Konzentration von 2% als am geeignetsten (nicht gezeigt). Zur Charakterisierung von Scp160p in der membranangereicherten Fraktion wurde P6 in Extraktionspuffer mit 2% Nikkol resuspendiert und von unsolubilisiertem Material durch nochmalige Zentrifugation bei 6000g getrennt.



Unter Niedrigsalz-Bedingungen kann so von dem in P6 sedimentierten Material etwa die Hälfte des Scp160p, der größte Teil des luminalen ER-Proteins Kar2p und mehr als die Hälfte von Sec61p und ribosomalen Proteinen (Rpl35p und Rps3p) solubilisiert werden (Abb. 3.4, Spuren 3-4). Nochmalige Zentrifugation des solubilisierten Materials bei 6000g führt nicht zu einer Sedimentation (Abb. 3.3 Spuren 5-6). Nach Zentrifugation bei 200000g kosedimentiert solubilisiertes Scp160p dagegen mit Ribosomen und Sec61p (Abb. 3.3 Spuren 7-8). Dies lässt vermuten, dass Scp160p aus P6 auch nach Nikkol-Behandlung in einem hochmolekularen Komplex bestehend aus Ribosomen, Sec61p und Scp160p vorliegt. Die partielle Solubilisierbarkeit von Scp160p zeigt, dass Scp160p aus P6 zumindest teilweise membrangebunden vorliegt. Weiterhin deutet die Zusammensetzung des solubilisierten Materials auf eine Assoziation dieses Scp160p-Anteils mit membranassoziierten Ribosomen hin.

Die Scp160p-Anteile in der membranangereicherten (P6) und der membranfreien Fraktion (S18) wurden durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation näher analysiert. Gesamtlysate (1200g-Überstand) von Cycloheximid-behandelten Zellen wurde auf einem 15-60% Sucrosegradient aufgetrennt und die Verteilung von Scp160p, Sec61p und dem ribosomalen Protein der großen Untereinheit Rpl35p durch Western-Blot analysiert (Abb. 3.4 A). Ribosomale 40S- und 60S-Untereinheiten sowie Monosomen finden sich in Fraktion 2 und 3, zytosolische Polysomen unterschiedlicher Größe verteilen sich auf die Fraktionen 3-7. Das ER-Membranprotein Sec61p kann in Fraktionen 8-10 nachgewiesen werden. Dieser Gradient erlaubt somit die Auftrennung von ER und zytosolischen Polysomen. Der Hauptteil von Scp160p findet sich in Fraktionen 3-10, ein geringerer Anteil in Fraktionen 1 und

2. Scp160p kosedimentiert daher weitgehend mit zytosolischen Polysomen und ER-Membranen.

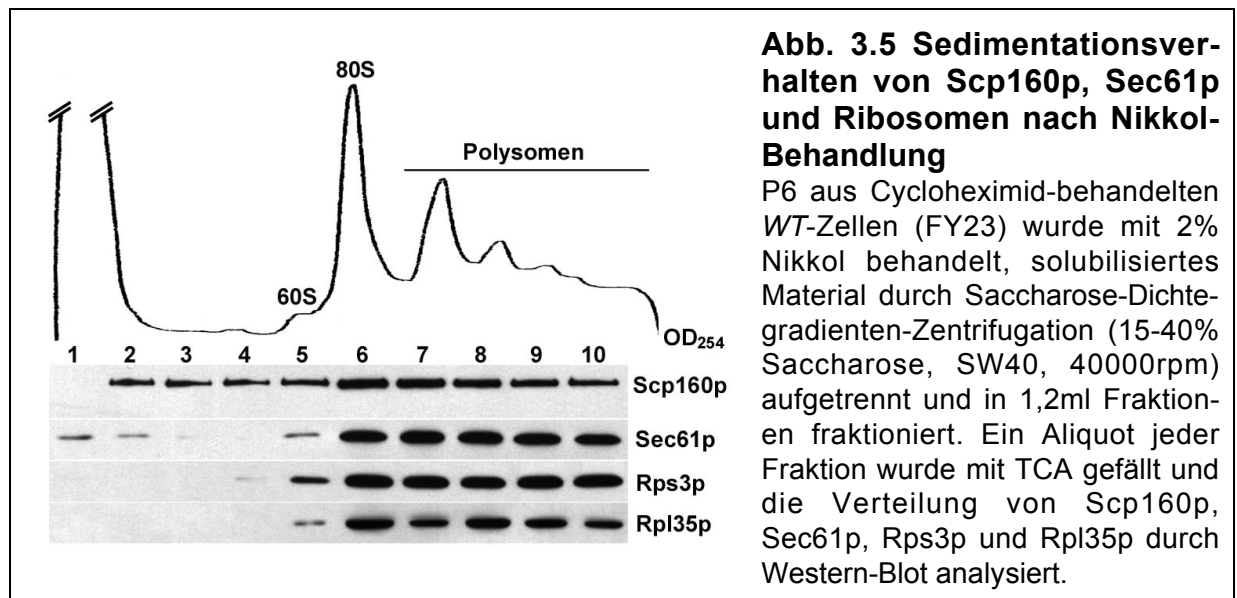


Durch Zentrifugation des Gesamt-Lysates bei 18000g wurde ein membranfreier Überstand S18 erhalten (vgl. Abb. 3.2, P200 und S200). Nach Auftrennung von S18 auf 15-60% Saccharose-Dichtegradienten können sowohl das ribosomale Markerprotein Rpl35p als auch Scp160p in Fraktionen 2-7 nachgewiesen werden. Scp160p ist in Fraktionen mit schweren Polysomen angereichert. In den Fraktionen 8-10 befindet sich dagegen kein Scp160p. In einem reversen Experiment wurde aus Gesamt-Lysat durch Zentrifugation bei 6000g eine membranangereicherte Fraktion

P6 präpariert (vgl. Abb. 3.2). Auf einem Saccharose-Dichtegradienten zeigt sich, dass diese Fraktion nur einen geringen Anteil an zytosolischen Polysomen enthält (Abb. 3.4 C, Fraktionen 2-7). Scp160p kosedimentiert in dieser Fraktion weitgehend mit Sec61p und Rpl35p in den Fraktionen 8-10.

Aus P6 durch Nikkol-Behandlung solubilisiertes Material wurde auf 15-60% Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt (Abb. 3.4 D). Der Großteil der analysierten Proteine Scp160p, Sec61p und Rpl35p kosedimentiert mit Ribosomen und Polysomen in den Fraktionen 2-7. Ein Vergleich zwischen nicht-solubilisiertem und solubilisiertem P6 (Abb. 3.4 C und D) zeigt, dass durch Nikkol-Behandlung ein großer Teil der ER-Membranen solubilisiert wurde. Ähnlich wie in der zytosolischen Fraktion S18 ist Scp160p nach Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Nikkol-behandeltem P6 in Fraktionen mit schweren Polysomen angereichert (Abb. 3.4 D).

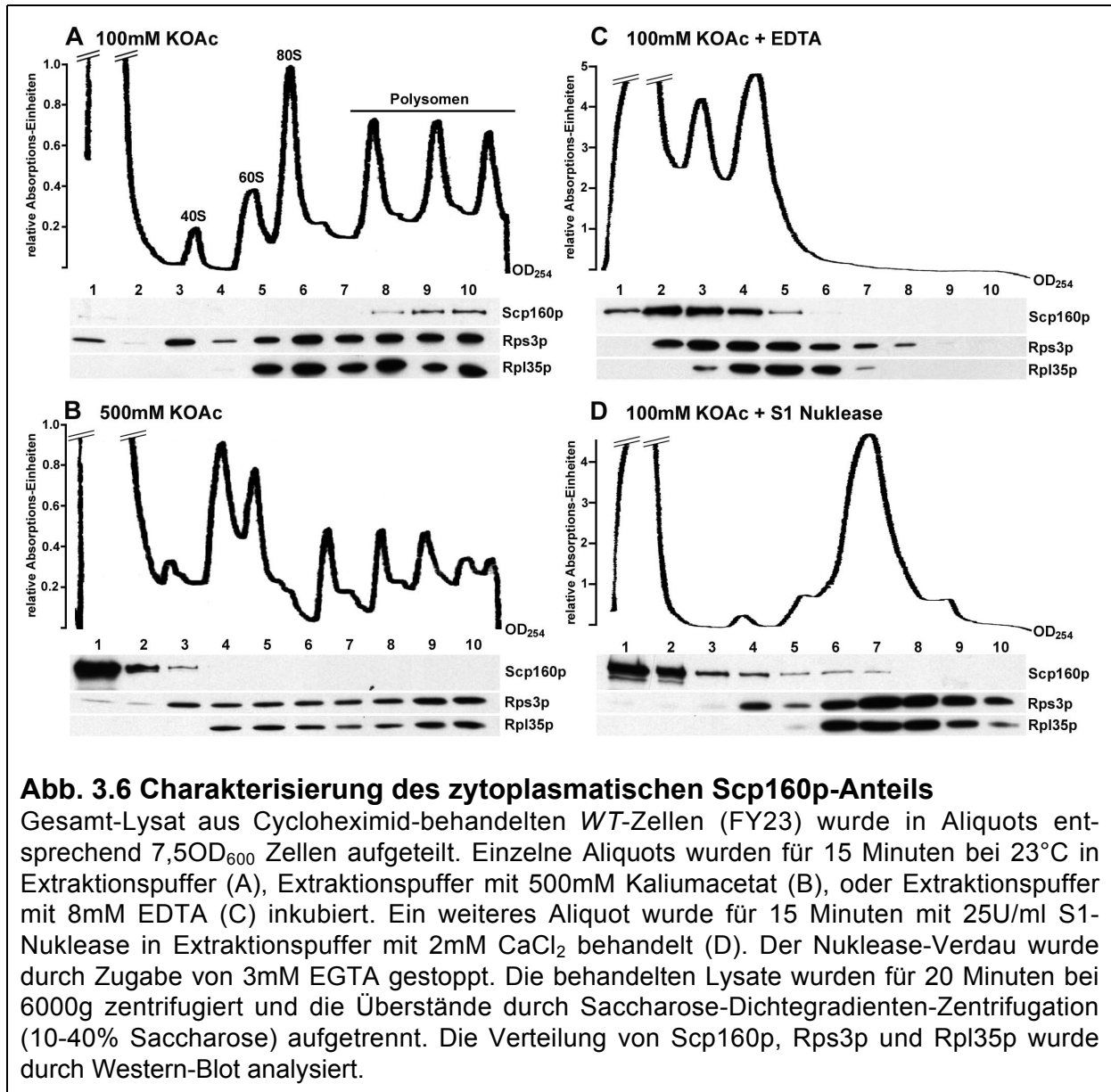
Eine ähnliche Analyse von solubilisiertem P6 auf einem 10-40%-Saccharose-Dichtegradienten ermöglicht eine Analyse mit höherer Auflösung. Auch auf diesem Gradienten kosedimentiert der Großteil von Sec61p und Scp160p mit Ribosomen (Abb. 3.5 Fraktionen 6-10). Zusammen mit den in Abb. 3.3 dargestellten Versuchen legen diese Daten nahe, dass nach Nikkol-Solubilisierung von P6 ein Komplex aus Sec61p, Ribosomen und Scp160p erhalten bleibt.



Die vorgestellten Versuche zeigen, dass Scp160p mit zytosolischen und membran-gebundenen Polysomen kosedimentiert. Nach Solubilisierung aus einer membran-angereicherten Fraktion kosedimentiert Scp160p mit Polysomen und dem ER-Markerprotein Sec61p.

3.1.2.3 Charakterisierung des zytoplasmatischen Scp160p-Anteils

Die zytosolische Fraktion von Scp160p wurde durch 10-40% Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht (Abb. 3.6). Der Großteil des nachweisbaren Scp160p in der membranfreien Fraktion kosedimentiert mit Polysomen (Abb. 3.6 A, Fraktionen 8-10). Schwere Polysomen mit assoziierten Proteinen pelletieren. Nur eine geringe Menge von Scp160p kann in den ribosomenfreien Fraktionen (1-5) nachgewiesen werden.



Nach Behandlung mit 500mM Kaliumacetat findet sich Scp160p weitgehend in den oberen, ribosomenfreien Fraktionen des Gradienten (Abb. 3.6 B, Fraktionen 1-3). In detaillierteren Salztitrationen wurde gefunden, dass *in vitro* Salzkonzentrationen über 125mM Kaliumacetat zur teilweisen Ablösung von Scp160p aus hochmolekularen Komplexen führen (nicht gezeigt). Entzug von Mg²⁺-Ionen durch EDTA-Zugabe führt

unter teilweise Verlust von peripheren ribosomalen Proteinen und 5S rRNA zur Dissoziation von 80S-Ribosomen und Polysomen in ribosomale Untereinheiten und mRNA (Blobel, 1971; Nolan & Arnstein, 1969). Nach Auftrennung einer EDTA-behandelten zytosolischen Fraktion wird Scp160p in Komplexen gefunden, die in ihrem Sedimentationsverhalten der kleinen ribosomalen Untereinheit ähneln (Abb. 3.6 C, Fraktionen 1-5). Hochauflösende Saccharose-Dichtegradienten zeigten jedoch, dass Scp160p nach EDTA-Behandlung nicht mit der kleinen ribosomalen Untereinheiten assoziiert (nicht gezeigt).

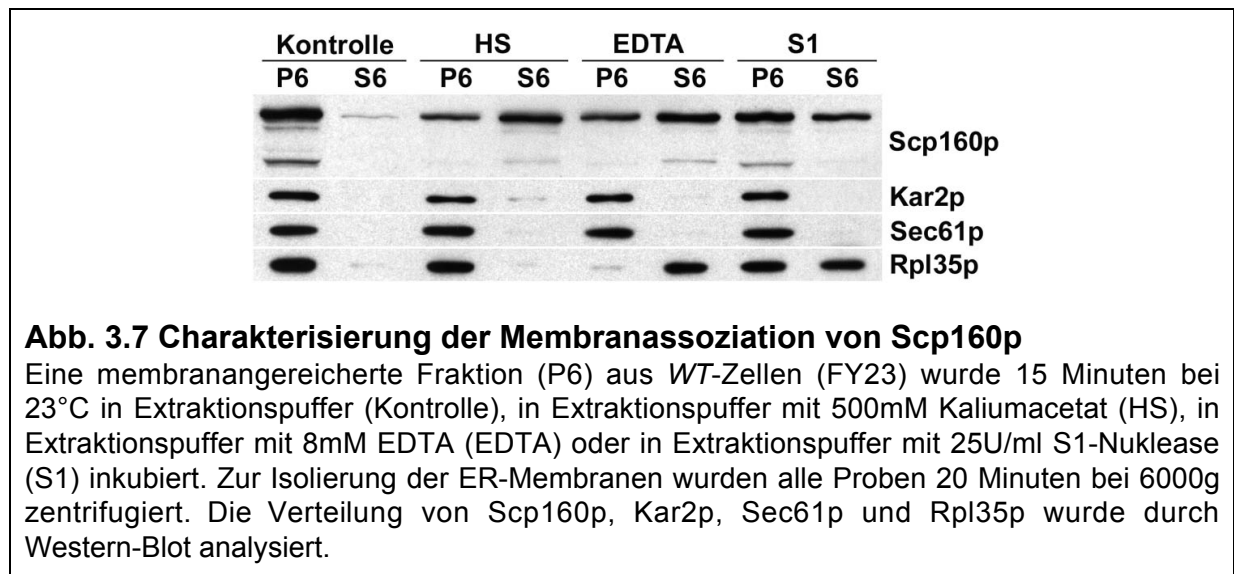
Um zu untersuchen, ob mRNA für die Kosedimentation von Scp160p mit Ribosomen nötig ist, wurde die mRNA selektiv durch milde Behandlung mit S1-Nuklease entfernt (Abb. 3.6 D). Nach S1-Verdau sedimentieren Ribosomen im Saccharose-Dichtegradient zumeist als Monosomen (Abb. 3.6 D, Fraktionen 6-9). Der überwiegende Anteil von Scp160p wird in den leichten Fraktionen im oberen Teil des Gradienten gefunden (Abb. 3.6 D, Fraktionen 1-2), nur ein geringer Anteil kosedimentiert mit ribosomalen Untereinheiten und Monosomen (Fraktionen 3-7).

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass Scp160p durch Spaltung von Ribosomen in die Untereinheiten, durch Verdau der mRNA oder durch Salzbehandlung von einem Polysomen-assoziierten in einen ribosomenfreien Zustand überführt werden kann. Diese Daten deuten darauf hin, dass Scp160p mRNA-abhängig mit zytosolischen Ribosomen interagiert. Dabei weist Scp160p eine Präferenz für schwere Polysomen auf.

3.1.2.4 Charakterisierung der Membranassoziation von Scp160p

Zur Charakterisierung der Interaktion von Scp160p mit membranassoziierten Komponenten wurde die membranangereicherte Fraktion P6 mit Hochsalz (500mM Kaliumacetat), EDTA oder zum Verdau von mRNA mit 25U/ml S1-Nuklease behandelt (Abb. 3.7).

Eine Kontrollinkubation für 15 Minuten bei 23°C in Extraktionspuffer führt zur Freisetzung nur geringer Scp160p-Mengen von P6. Inkubation mit 500mM Kaliumacetat oder Entzug von Mg^{2+} -Ionen durch EDTA setzt dagegen einen Großteil von Scp160p aus P6 frei. Während nach Behandlung mit 500mM Kaliumacetat die Ribosomen im Pellet verbleiben, entlässt EDTA-Behandlung neben Scp160p auch Ribosomen von P6. Dies legt nahe, dass Scp160p zumindest zum Teil durch seine Interaktion mit Ribosomen mit der Membran interagiert. Ein Verdau von mRNA mit geringen Konzentrationen S1-Nuklease (25U/ml) führt zur teilweisen Freisetzung von Scp160p und Ribosomen. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil von Scp160p mRNA-abhängig mit membrangebundenen Ribosomen interagiert.



Im Vergleich zur Inkubation mit EDTA ist Freisetzung nach Behandlung mit S1-Nuklease weniger effizient. Der vergleichsweise geringe Effekt eines mRNA-Verdaus lässt daher vermuten, dass die Interaktion von Scp160p mit der Membran neben der Assoziation mit Ribosomen zusätzlich durch RNA-unabhängige Faktoren vermittelt wird.

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass die Interaktionen von Scp160p mit zytosolischen und membrangebundenen Ribosomen in Bezug auf ihre mRNA-Abhängigkeit und Salzsensitivität ähnliche Charakteristika aufweisen.

3.1.2.5 Lokalisation von Scp160p nach Überexpression

Zur weiteren Charakterisierung der Membranassoziation von Scp160p wurde die Lokalisation von GFP-Scp160p in Zellen analysiert, die *WT-SCP160* von einem *CEN*-Plasmid überexprimieren. GFP-Scp160p verhält sich bezüglich seiner Polysomen-Assoziation wie *WT*-Scp160p (Frey *et al.*, 2001). Die Expression von *WT-SCP160* von einem *CEN*-Plasmid führt zu einer etwa 4-fach erhöhten Konzentration von Scp160p (nicht gezeigt) und einer signifikanten Umverteilung von GFP-Scp160p vom ER ins Zytosol (Abb. 3.8, rechtes Bild). Dieses Ergebnis zeigt, dass nach Überexpression von Scp160p die Scp160p-Bindestellen an der ER-Membran gesättigt werden. Weitere Analysen anhand von Saccharose-Dichtegradienten zeigten zudem, dass durch Überexpression von *WT-SCP160* die Assoziation von GFP-Scp160p sowohl mit membrangebundenen als auch mit zytosolischen Polysomen sättigbar ist (Frey *et al.*, 2001).

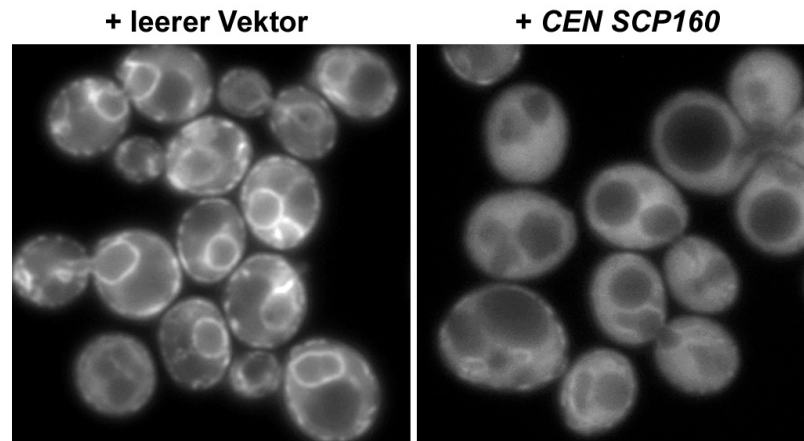


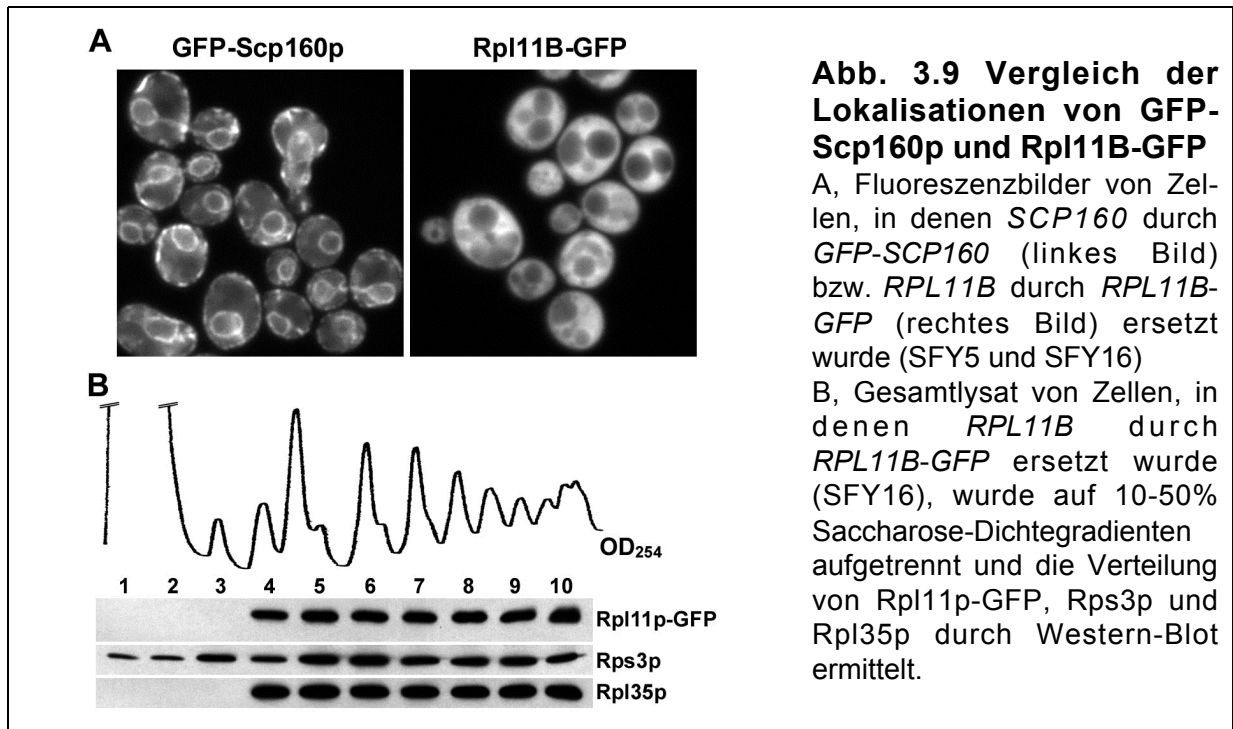
Abb. 3.8 Einfluss einer Überexpression von *WT-SCP160* auf die Lokalisation von GFP-Scp160p

GFP-SCP160-exprimierende Hefen (SFY5) mit einem leeren *CEN*-Plasmid (pRS315; linkes Bild) oder mit einem *SCP160*-kodierenden *CEN*-Plasmid (pMS346; rechtes Bild) wurden in selektivem Medium angezogen und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

3.1.2.6 Vergleich der Lokalisationen von Scp160p und Rpl11Bp, einem Protein der großen ribosomalen Untereinheit

In den zuvor vorgestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Scp160p sowohl mit zytosolischen als auch mit membrangebundenen Polysomen interagiert. Dabei zeigten Zellfraktionierungs-Experimente, dass Scp160p in einer membranangereicherten Fraktion in Relation zu Ribosomen stark angereichert ist (vgl. Abb. 3.2). Aufgrund der Durchführung der Experimente *in vitro* kann nicht ausgeschlossen werden, dass Scp160p erst nach einem Zellaufschluss mit Komponenten in der membranangereicherten Fraktion interagiert. In einem weiteren Experiment wurde daher untersucht, ob die unterschiedliche Affinität von Scp160p für membrangebundene und zytosolische Polysomen auch *in vivo* anhand der Lokalisation von Scp160p und Ribosomen nachgewiesen werden kann.

Die Lokalisation der Gesamtheit aller Ribosomen in der Zelle wurde durch Fluoreszenzmikroskopie in einem Stamm untersucht, in dem *RPL11B* durch ein funktionelles *RPL11B-GFP*-Fusionskonstrukt (Stage-Zimmermann *et al.*, 2000) ersetzt wurde (Abb. 3.9 A, rechtes Bild). Auf Saccharose-Dichtegradienten kofraktioniert Rpl11B-GFP ausschließlich mit ribosomalen 60S-Untereinheiten, Monosomen und Polysomen (Abb. 3.9 B, Fraktionen 4-10). Ribosomenfreies Rpl11B-GFP ist nicht nachweisbar (Fraktionen 1-3). Rpl11B-GFP kosedimentiert mit Rpl35p, einem weiteren Protein der großen ribosomalen Untereinheit. Rpl11B-GFP verhält sich daher wie ein Protein der 60S-ribosomalen Untereinheit (Abb. 3.9 B). Damit kann Rpl11B-GFP zur Bestimmung der Lokalisation von Ribosomen in lebenden Zellen herangezogen werden.



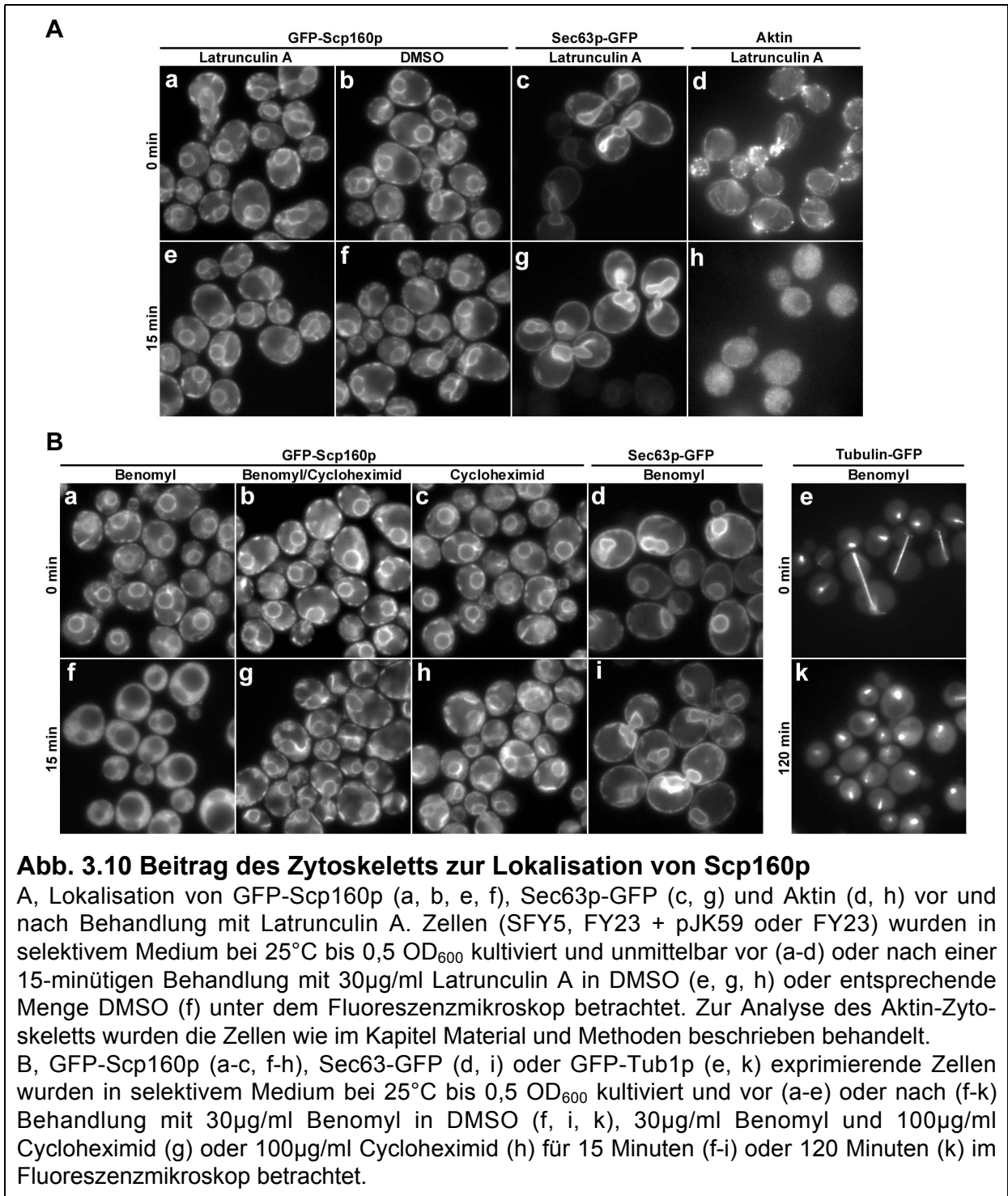
Rpl11B-GFP-Fluoreszenz ist im gesamten Zytosol, nicht jedoch in der Vakuole und nur schwach im Zellkern nachweisbar (Abb. 3.9 A, rechtes Bild). Diese Verteilung unterscheidet sich stark von der typischen Lokalisation von Ribosomen-assoziiertem GFP-Scp160p (Abb. 3.9 A, linkes Bild). Diese Daten zeigen, dass Scp160p bevorzugt mit membrangebundenen Ribosomen interagiert.

3.1.3 Beitrag des Zytoskeletts zur Lokalisation von Scp160p

Um den Beitrag des Zytoskeletts zur ER-Assoziation von Scp160p zu untersuchen, wurde der Effekt einer Depolymerisation von Aktin-Filamenten oder Mikrotubuli durch Latrunculin A (Ayscough & Drubin, 1998) beziehungsweise Benomyl (Stearns *et al.*, 1990) auf die Lokalisation von GFP-Scp160p untersucht.

Zur Analyse der Auswirkung einer Latrunculin A-Behandlung wurde die Lokalisation von GFP-Scp160p, Sec63p-GFP und Aktin vor oder nach Behandlung mit Latrunculin A oder dem gleichen Volumen DMSO untersucht. In unbehandelten Zellen zeigen alle untersuchten Proteine ihre charakteristischen Lokalisationen (Abb. 3.10 A, a-d): GFP-Scp160p und Sec63p-GFP sind in perinukleären und kortikalen Strukturen angereichert (Abb. 3.10 A, a-c), die Aktin-Färbung zeigt kabelartige Strukturen, die häufig eine Orientierung zur Tochterzelle aufweisen (Abb. 3.10 A, d). Nach Behandlung mit Latrunculin A für 15 Minuten ist das Aktin-Signal diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.10 A, h). Die Signale von GFP-Scp160p und Sec63p-GFP zeigen nach 15 Minuten Behandlung mit Latrunculin A keine Veränderung gegenüber unbehandelten Zellen. Auch nach einer Kontrollinkubation mit DMSO ist

die Lokalisation von GFP-Scp160p unverändert. Dies zeigt, dass Latrunculin A zu einer Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts, nicht jedoch zu einer Veränderung der Lokalisation von GFP-Scp160p oder Sec63p-GFP führt. Ein funktionelles Aktin-Zytoskelett ist daher für Lokalisation von GFP-Scp160p nicht nötig.



Die Auswirkungen einer Mikrotubuli-Depolymerisation und/oder einer Hemmung der Translations-Elongation wurden durch Analyse der Lokalisation von GFP-Scp160p,

Sec63p-GFP und Tubulin-GFP vor oder nach Behandlung mit unterschiedlichen Kombinationen von Benomyl und Cycloheximid untersucht. In unbehandelten Zellen zeigen GFP-Scp160p und Sec63p-GFP die typische perinukleäre und kortikale Lokalisation (Abb. 3.10 B, a-d). Das Tubulin-GFP-Signal erscheint in einigen Zellen als langgestreckte Struktur, die sich von der Mutterzelle bis in die Tochterzelle erstreckt, in anderen Zellen als heller Punkt (Abb. 3.10 B, e). Nach 15 Minuten Behandlung mit Benomyl ist eine einsetzende Verkürzung der langgestreckten Tubulin-Strukturen zu beobachten (nicht gezeigt). Nach zwei Stunden lokalisiert Tubulin-GFP ausschließlich in punktförmigen Strukturen (Abb. 3.10 B, k). Dies zeigt, dass Benomyl zu einer Depolymerisation von Mikrotubuli führt. 15 Minuten Behandlung mit Benomyl führen zu einer homogenen Verteilung von GFP-Scp160p im Zytosol (Abb. 3.10 B, f). Die Lokalisation von Sec63-GFP wird durch gleiche Behandlung mit Benomyl nicht beeinflusst (Abb. 3.10 B, i). Nach gleichzeitiger Behandlung von Zellen mit Benomyl und Cycloheximid oder Cycloheximid alleine zeigt GFP-Scp160p eine ähnliche Lokalisation wie in unbehandelten Zellen (Abb. 3.10 B, g und h). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Depolymerisation von Mikrotubuli durch Nocodazol erhalten (nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass eine Depolymerisation von Mikrotubuli bei gleichzeitiger aktiver Proteinsynthese zum Verlust der ER-Lokalisation von GFP-Scp160p führt. Eine Inhibition der Translations-Elongation durch Cycloheximid verhindert dagegen die durch Depolymerisation von Mikrotubuli induzierte Umverteilung von GFP-Scp160p vom ER ins Zytosol.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass (i) die Akkumulation von Scp160p an der ER-Membran ein intaktes Tubulin-Zytoskelett benötigt, (ii) die Umverteilung von GFP-Scp160p vom ER ins Zytosol nach Mikrotubuli-Depolymerisation von Translation abhängt und (iii) die Verankerung von Scp160p am ER unabhängig von Mikrotubuli ist.

3.2 Analyse der Domänenstruktur von Scp160p

In den folgenden Experimenten wurden die Beiträge einzelner Domänen und Sequenzen innerhalb von Scp160p zu seiner Lokalisation und Polysomen-Assoziation sowie die Bedeutung dieser Proteinbereiche für die Kontrolle des zellulären DNA-Gehalts untersucht.

3.2.1 Auswirkungen einer Deletion von Scp160p-Fragmenten auf den zellulären DNA-Gehalt und die Polysomen-Assoziation von Scp160p

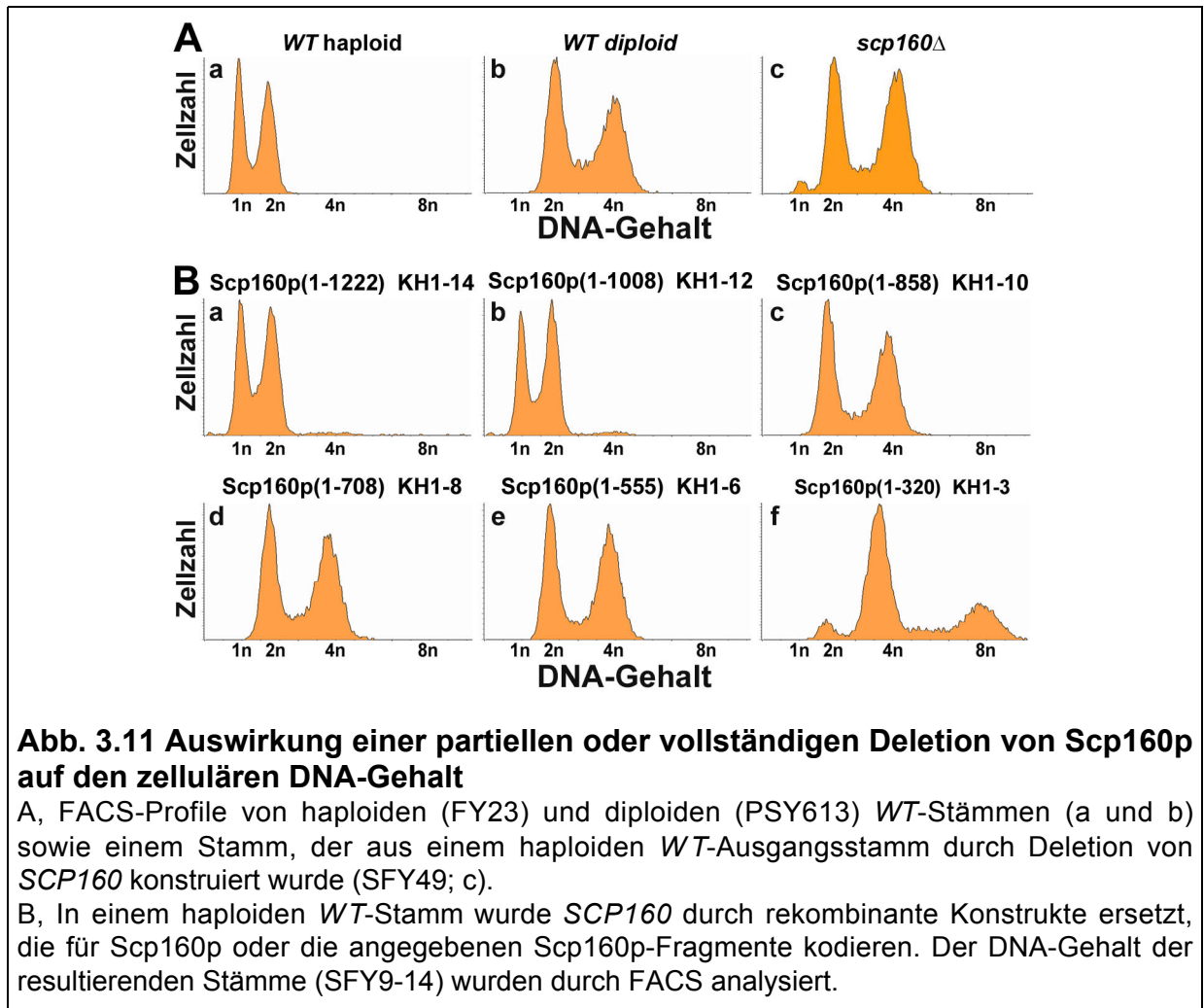
Im Rahmen der Erstbeschreibung von Scp160p wurde gezeigt, dass Deletion von *SCP160* nach wenigen Zellteilungen neben anderen Phänotypen zu einer Zunahme des DNA-Gehalts führt (Wintersberger *et al.*, 1995). Dieser Effekt ist nach Transformation mit einem Scp160p-kodierenden Plasmid nicht reversibel.

Durch FACS-Analyse des zellulären DNA-Gehalts eines Stammes, der durch Deletion von *SCP160* in einem haploiden *WT*-Stammhintergrund konstruiert wurde, sowie je eines haploiden und eines diploiden *WT*-Kontrollstammes wurde der beschriebene Chromosomensegregations-Defekt näher untersucht.

Ein haploider *WT*-Stamm zeigt ein FACS-Profil mit zwei charakteristischen Peaks bei einfachem (1n) und doppeltem (2n) Chromosomensatz, die der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus zugeordnet werden können (Abb. 3.11 A, a). In einem diploiden *WT*-Stamm erscheinen entsprechende Peaks bei 2n bzw. 4n (Abb. 3.11 A, b). Das FACS-Profil eines aus einem haploiden *WT*-Stamm hervorgegangenen *scp160Δ*-Stammes (Abb. 3.11 A, c) zeigt Peaks bei 2n und 4n DNA-Gehalt. Nur ein sehr geringer Teil der Zellen weist einfachen DNA-Gehalt (1n) auf. Der DNA-Gehalt eines *scp160Δ*-Stammes entspricht damit weitgehend dem eines diploiden *WT*-Stammes. Der *scp160Δ*-Stamm zeigt folglich einen pseudo-diploiden Phänotyp.

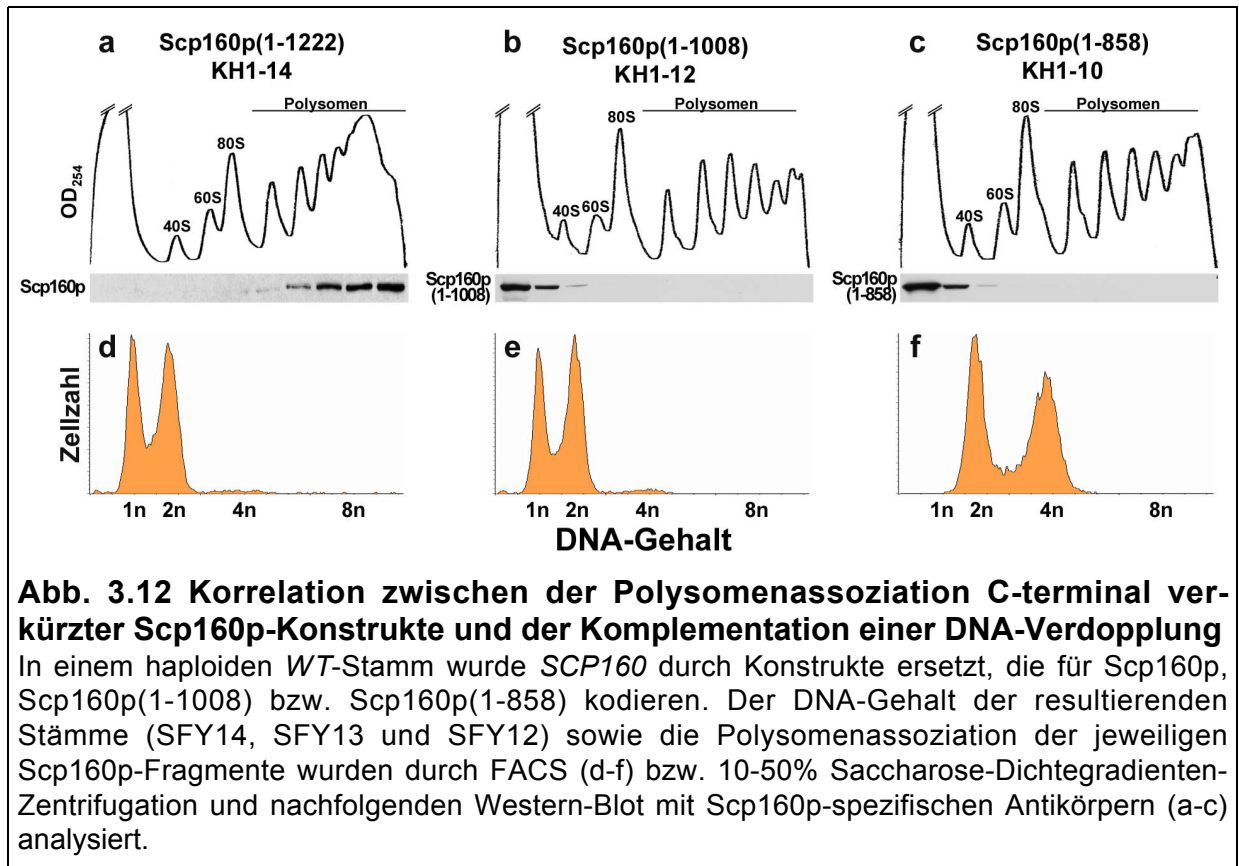
Anhand von Stämmen, in denen das genomische *SCP160* durch reintegriertes *WT-SCP160* oder Genfragmente ersetzt wurde, die für C-terminal verkürztes Scp160p kodieren, wurde untersucht, welche Bereiche von Scp160p zur Komplementation der beobachteten DNA-Verdopplung nötig sind. Nach Austausch des endogenen *SCP160* durch rekombinante Konstrukte, die für Scp160p (Abb. 3.11 B, a) oder Scp160p(1-1008) (KH1-12; Abb. 3.11 B, b) kodieren, zeigen die resultierenden Stämme FACS-Profile mit Peaks bei 1n und 2n, die der Situation im haploiden Kontrollstamm entsprechen (Abb. 3.11 A, a). Stämme, die Scp160p-Konstrukte mit 6 bis 10 N-terminalen KH-Domänen (KH1-6, KH1-8 und KH1-10) exprimieren, zeigen dagegen eine Verdopplung des zellulären DNA-Gehalts (Abb. 3.11 B, c-e). Der Austausch von Scp160p gegen ein Konstrukt, das nur die N-terminalen 320 Aminosäuren (KH-Domänen 1-3) umfasst, führt zu einem FACS-Profil mit dominierenden

Peaks bei 4n und 8n DNA-Gehalt. Ein geringerer Anteil Zellen zeigt einen 2n-DNA-Gehalt (Abb. 3.11 B, f).



Diese Daten zeigen, dass Deletion der beiden C-terminalen KH-Domänen von Scp160p nicht zu einer Verdopplung des zellulären DNA-Gehalts führt. Deletion von mehr als drei C-terminalen KH-Domänen von Scp160p führt dagegen zu einer Verdopplung der DNA, ein Stamm, der nur die N-terminalen 320 Aminosäuren (KH1-3) von Scp160p exprimiert zeigt einen vervierfachen DNA-Gehalt.

Durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde untersucht, welche Domänen von Scp160p zur Ribosomenassoziation von Scp160p nötig sind. Dazu wurde *SCP160* in einem haploiden *WT*-Stamm durch Genfragmente ersetzt, die für Scp160p, Scp160p(1-1008) bzw. Scp160p(1-858) kodieren. Eine zytosolische Fraktion aus Gesamtlysat dieser Stämme wurde durch 10-50% Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt und einzelne Fraktionen durch Western-Blot mit Scp160p-spezifischen Antikörpern analysiert.



Reintegriertes WT-Scp160p kann nach Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation in den unteren Fraktionen des Gradienten nachgewiesen werden, in denen sich auch Polysomen befinden (Abb. 3.12, a). Nach Deletion von zwei oder mehreren C-terminalen KH-Domänen finden sich die resultierenden Scp160p-Fragmente dagegen in den zwei obersten, polysomenfreien Fraktionen der Gradienten (Abb. 3.12, b und c). Die KH-Domänen 13 und 14 sind daher für eine Polysomenassoziation notwendig. Eine Gegenüberstellung der durch FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse (Abb. 3.12, d-e, vgl. Abb. 3.11 B, a-c) und der Polysomenassoziation zeigt, dass Scp160p(1-1008) zwar nicht mit Polysomen interagiert, jedoch in der Lage ist, eine DNA-Verdopplung zu komplementieren. Diese Daten verdeutlichen, dass eine Polysomen-Assoziation von Scp160p für die Komplementation der DNA-Verdopplung nicht zwingend nötig ist.

3.2.2 Identifizierung und Charakterisierung eines Kernimport-Signals in Scp160p

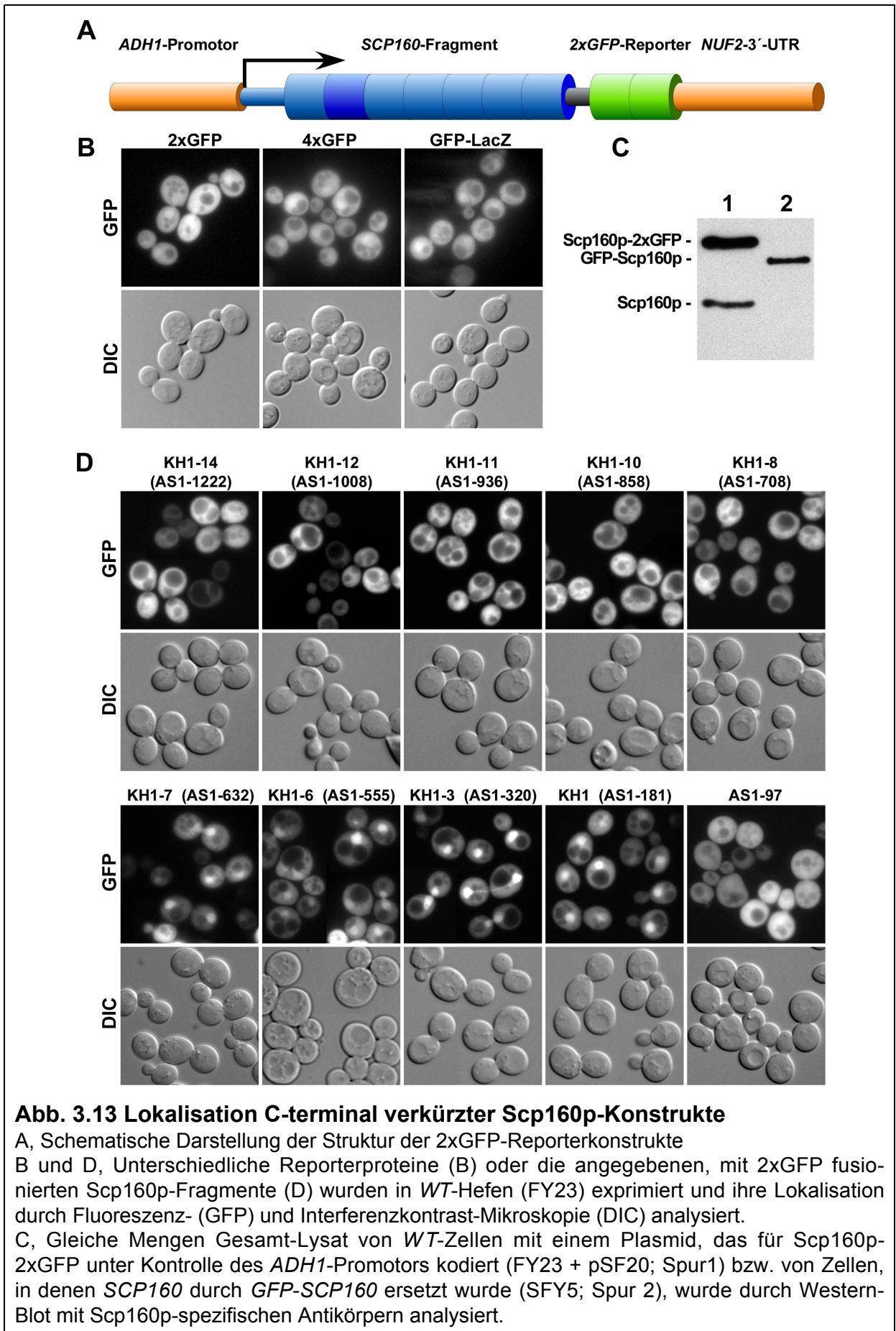
Neben zytosolischen Funktionen wurden für Mitglieder der Vigilin-Proteinfamilie in höheren Eukaryonten Funktionen vorgeschlagen, die mit einer Kernlokalisierung der Proteine oder mit ihrem Transport zwischen Zytosol und Zellkern vereinbar sind (Cortes & Azorin, 2000; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000). In einigen dieser Proteine wurden Kernimport- und Kernexport-Signale beschrieben. Die Funktionalität dieser Domänen sowie eine Kernlokalisierung der Proteine konnte zum Teil experimentell bestätigt werden (Cortes & Azorin, 2000; Cortes *et al.*, 1999; Klinger & Kruse, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kugler *et al.*, 1996). Die bevorzugt zytosolische und membranassoziierte Lokalisation von Scp160p schließt nicht aus, dass auch Scp160p unter bestimmten Bedingungen im Kern zu finden ist. So kann der Defekt einer *scp160Δ*-Mutante bei der Verteilung von Chromosomen als Hinweis auf eine nukleäre Funktion und somit auf eine zumindest transiente Kernlokalisierung von Scp160p betrachtet werden. Zudem wurden auch in Scp160p anhand von Homologien sowohl ein potentiell zweiteiliges Kernimportsignal (NLS, AS 321-333) als auch ein mögliches leucinreiches Kernexportsignal (NES, AS 52-61) identifiziert (Weber *et al.*, 1997). Die Funktionalität dieser Kerntransportsignale wurde jedoch bisher nicht untersucht.

3.2.2.1 Lokalisation C-terminal verkürzter Scp160p-Konstrukte nach Überexpression

In den folgenden Abschnitten wurden anhand eines GFP-Reporterassays die Beiträge einzelner Domänen und Sequenzen zur Lokalisation von Scp160p untersucht.

Scp160p bzw. C- oder N-terminal verkürzte Scp160p-Konstrukte wurden am C-Terminus mit zwei Kopien einer fluoreszenzoptimierten GFP-Variante (G65T, V163A) (Kahana & Silver, 1996) sowie der 3'-nichttranslatierten Region (3'-UTR) von *NUF2* fusioniert. Die resultierenden Fusionsproteine wurden in *WT*-Hefen von einem Plasmid mit geringer Kopienzahl (*CEN*-Plasmid) unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert (Abb. 3.13 A) und ihre Lokalisation durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Mit der gleichen Strategie wurden die Lokalisationen von 2xGFP, 4xGFP und des GFP-LacZ-Fusionsproteins als Beispiele für Proteine ohne Kerntransport-Signale untersucht.

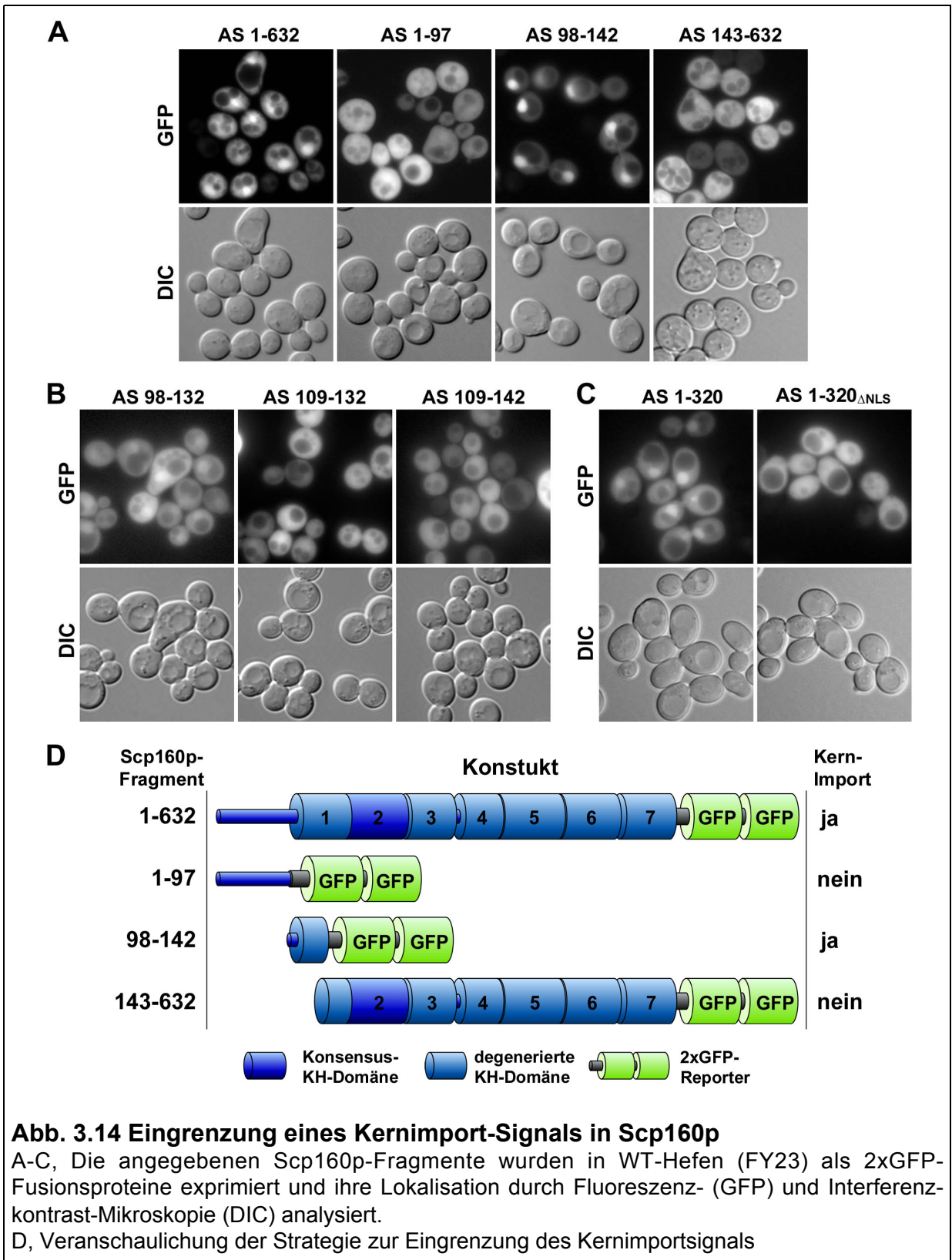
2xGFP, 4xGFP sowie das GFP-LacZ-Fusionsprotein zeigen ein weitgehend gleichmäßiges Fluoreszenzsignal im Zytoplasma und Zellkern, kein Signal findet sich in der Vakuole (Abb. 3.13 B). Da keines der Referenzproteine ein Kernimport-Signal enthält, ist ihr gleichmäßiges Auftreten in Zellkern und Zytoplasma Zeichen ihres diffusionsbedingten Austauschs zwischen beiden Kompartimenten.



Eine von dieser Gleichverteilung abweichende Lokalisation der im folgenden betrachteten Fusionsproteine ähnlicher Größe kann daher auf Beiträge der an den 2xGFP-Reporter fusionierten Scp160p-Fragmente zurückgeführt werden. Im Vergleich zur Menge von WT-Scp160p (Abb. 3.13 C, Spur 1; Scp160p) oder von GFP-Scp160p (Spur 2) unter Kontrolle des *SCP160*-Promotors führt die Expression von *SCP160-2xGFP* von einem zentromeren Plasmid unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors zu einer mehrfach erhöhten Proteinmenge (Abb. 3.13 C, Spur 1; Scp160p-2xGFP). Diese Überexpression führt ähnlich wie zuvor beschrieben (Abb. 3.8) zur Sättigung Scp160p-spezifischer Bindungsstellen am ER und zu einer weitgehend gleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma (Abb. 3.13 D, KH1-14). Im Zellkern, der sich in Stadien mit großer Tochterzelle häufig im Verbindungsbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle befindet, ist ein nur geringes oder kein Signal zu beobachten. Eine schrittweise Deletion C-terminaler KH-Domänen von Scp160p führt zu einer graduellen Verschiebung der GFP-Signale zwischen Zytoplasma und Zellkern (Abb. 3.13 D): Scp160p(1-1008)-2xGFP zeigt wie das Voll-längenprotein keine oder nur geringe Fluoreszenz im Kern. Nach Deletion von 3 bis 6 KH-Domänen befindet sich ein zunehmender Teil des GFP-Signals im Zellkern: Scp160p(1-708)-2xGFP ist zwischen Zellkern und Zytoplasma etwa gleichverteilt (Abb. 3.13 D, KH1-8). Fusion von einer bis sieben N-terminaler KH-Domänen von Scp160p mit 2xGFP führt zu einer Anreicherung von GFP-Fluoreszenz im Zellkern (Abb. 3.13 D, untere Reihe). Die KH-Domänen-freien 97 N-terminalen AS von Scp160p bewirken hingegen keine Anreicherung von GFP-Signal im Zellkern (Abb. 3.13 D, AS1-97). Diese Versuche zeigen, dass eine Sequenz innerhalb der N-terminalen 181 AS von Scp160p das Potential hat, ein 2xGFP-Reporter-Protein im Kern anzureichern.

3.2.2.2 Eingrenzung eines Kernimport-Signals in Scp160p

Ausgehend von Scp160p(1-632)-2xGFP, dem größten Konstrukt, das zu einer Anreicherung von GFP-Signal im Zellkern führt (Abb. 3.14 A, AS 1-632), wurde das Kernimport-Signal sequentiell eingegrenzt (Abb. 3.14 A, B). Fusion der AS 1-97 oder AS 143-632 von Scp160p mit dem 2xGFP-Reporter führt zu gleichmäßig zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilten GFP-Signalen (Abb. 3.14 A, AS 1-97 und AS 143-632). Nach Fusion der AS 98-142 von Scp160p mit 2xGFP kann dagegen eine Anreicherung von GFP-Fluoreszenz im Zellkern beobachtet werden (Abb. 3.14 A, AS 98-142). Der einzige Bereich innerhalb dieser N-terminalen 632 AS von Scp160p, der eine Anreicherung des 2xGFP-Reporters im Zellkern vermittelt, befindet sich daher zwischen AS 98 und 142. Die C-terminale Hälfte von Scp160p (AS 633-1222) wurde aufgrund einer zytosolischen Retention von Konstrukten mit intaktem C-Terminus (vgl. Diskussion) nicht in einem Kernimportassay analysiert.



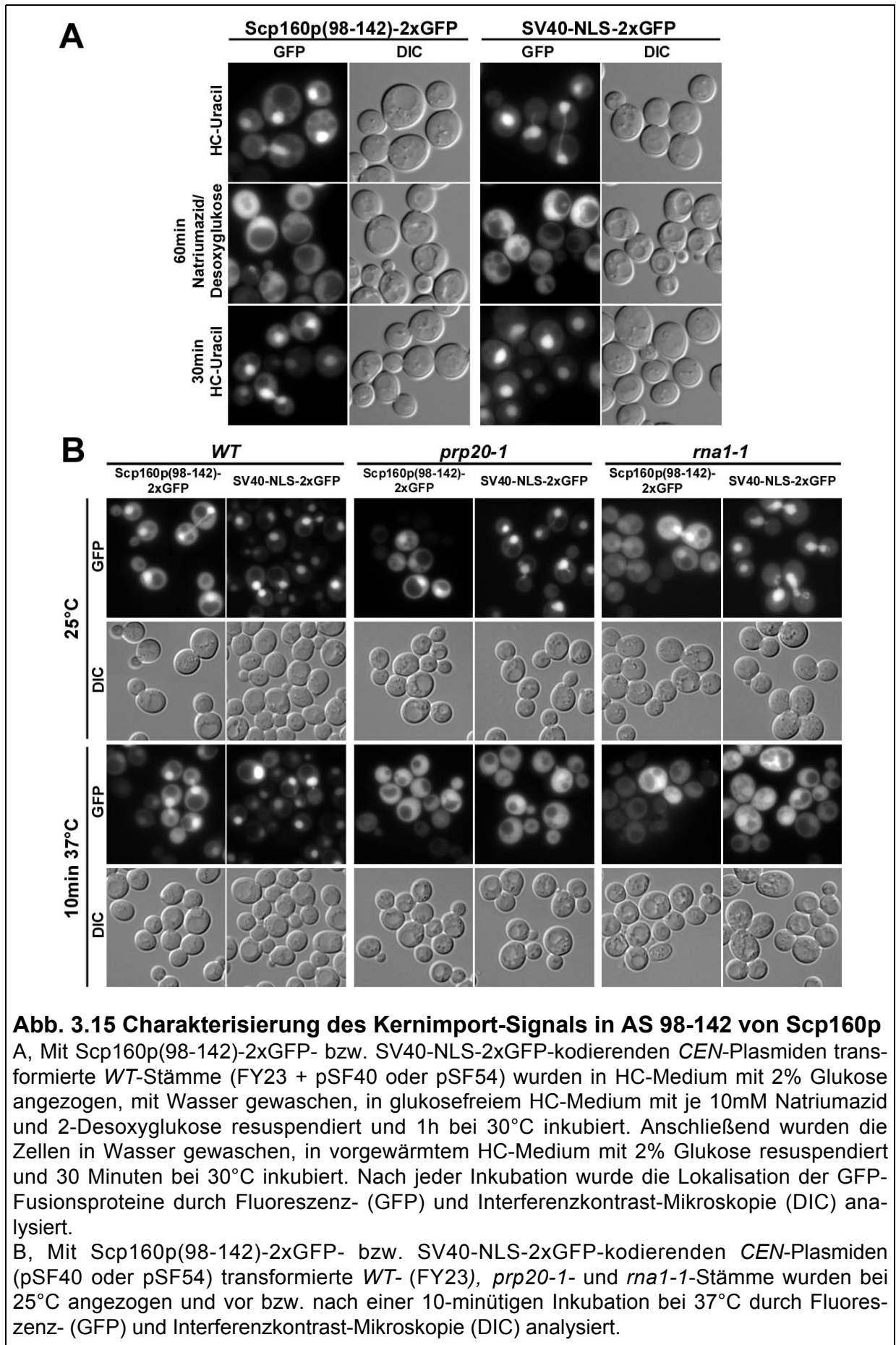
Zur genaueren Eingrenzung der Kernimportaktivität wurden weitere 11 bzw. 10 AS vom N- und/oder C-Terminus der Kernimport-aktiven Sequenz (AS 98-143) deletiert. Dies führt bei allen resultierenden Konstrukten zu gleichmäßig zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilten GFP-Signalen (Abb. 3.14 B) und daher zum vollständigen

Verlust der Importaktivität. Ähnlich effektiv verhindert die Mutation von vier basischen AS innerhalb der eingegrenzten Importdomäne („ Δ NLS“: K102Q, R103W, R105H, K107E) eine Kernanreicherung von ansonsten importaktiven Konstrukten (Abb. 3.14 C). Das Kernimport-Signal in den AS 98-142 benötigt somit für eine volle Funktionalität Teile seiner N- und C-terminalen Bereiche. Insbesondere ist die Anwesenheit der vier basischen AS K102, R103, R105 und K107 im N-terminalen Bereich des Signals für eine Kernimportaktivität essentiell.

3.2.2.3 Charakterisierung des Kernimport-Signals in AS 98-142

Die Charakteristika des identifizierten Kernimport-Signals von Scp160p wurden im folgenden näher untersucht. Eine erhöhte Konzentration von Scp160p(98-142)-2xGFP im Zellkern lässt zunächst keine Aussage darüber zu, ob die beobachtete Anreicherung ein aktiver, energieabhängiger Prozess oder Folge einer passiven Interaktion mit Strukturen im Zellkern ist. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde untersucht, ob der Kernimport von Scp160p(98-142)-2xGFP von der Verfügbarkeit von Energie und von der im Kerntransport zentralen monomeren GTPase Ran abhängt. Ein typisches Kernlokalisations-Signal, das einen Energie- und Ran-abhängigen Import von Reporterproteinen in den Zellkern vermittelt, ist das SV40-NLS (Dingwall & Laskey, 1998). Ein analog zu den Scp160-2xGFP-Fusionsproteinen konstruiertes SV40-NLS-2xGFP Reporterkonstrukt wurde daher in den folgenden Versuchen als Kontrolle eingesetzt.

Die Energieabhängigkeit des Kernimports von Scp160p(98-142)-2xGFP wurde nach (Shulga *et al.*, 1996) analysiert: Die Lokalisation von Scp160p(98-142)-2xGFP sowie des Kontrollkonstruktes SV40-NLS-2xGFP wurde unter normalen Wachstumsbedingungen, nach Hemmung energieabhängiger Prozesse durch Behandlung Natriumazid und 2-Desoxy-*D*-Glukose sowie nach Auswaschen der Inhibitoren untersucht (Abb. 3.15 A). Scp160p(98-142)-2xGFP ist unter normalen Wachstumsbedingungen ähnlich wie das SV40-NLS-2xGFP-Kontrollprotein im Zellkern angereichert (Abb. 3.15 A, obere Reihe). Behandlung mit Natriumazid und 2-Desoxy-*D*-Glukose führt zu einer gleichmäßigen Verteilung von Scp160p(98-142)-2xGFP und SV40-NLS-2xGFP zwischen Kern und Zytoplasma (Abb. 3.15 A, mittlere Reihe). Nach Auswaschen der Inhibitoren und 30 Minuten Wachstum in glukosehaltigem Medium sind beide betrachteten 2xGFP-Fusionsproteine wieder stark im Kern angereichert. Diese Daten zeigen, dass der Kernimport von Scp160p(98-142)-2xGFP ebenso wie der Import des SV40-NLS-2xGFP Kontrollproteins ein energieabhängiger und somit aktiver Prozess ist. Keines der beiden 2xGFP-Fusionsproteine wird durch energieunabhängige Interaktionen im Kern konzentriert.



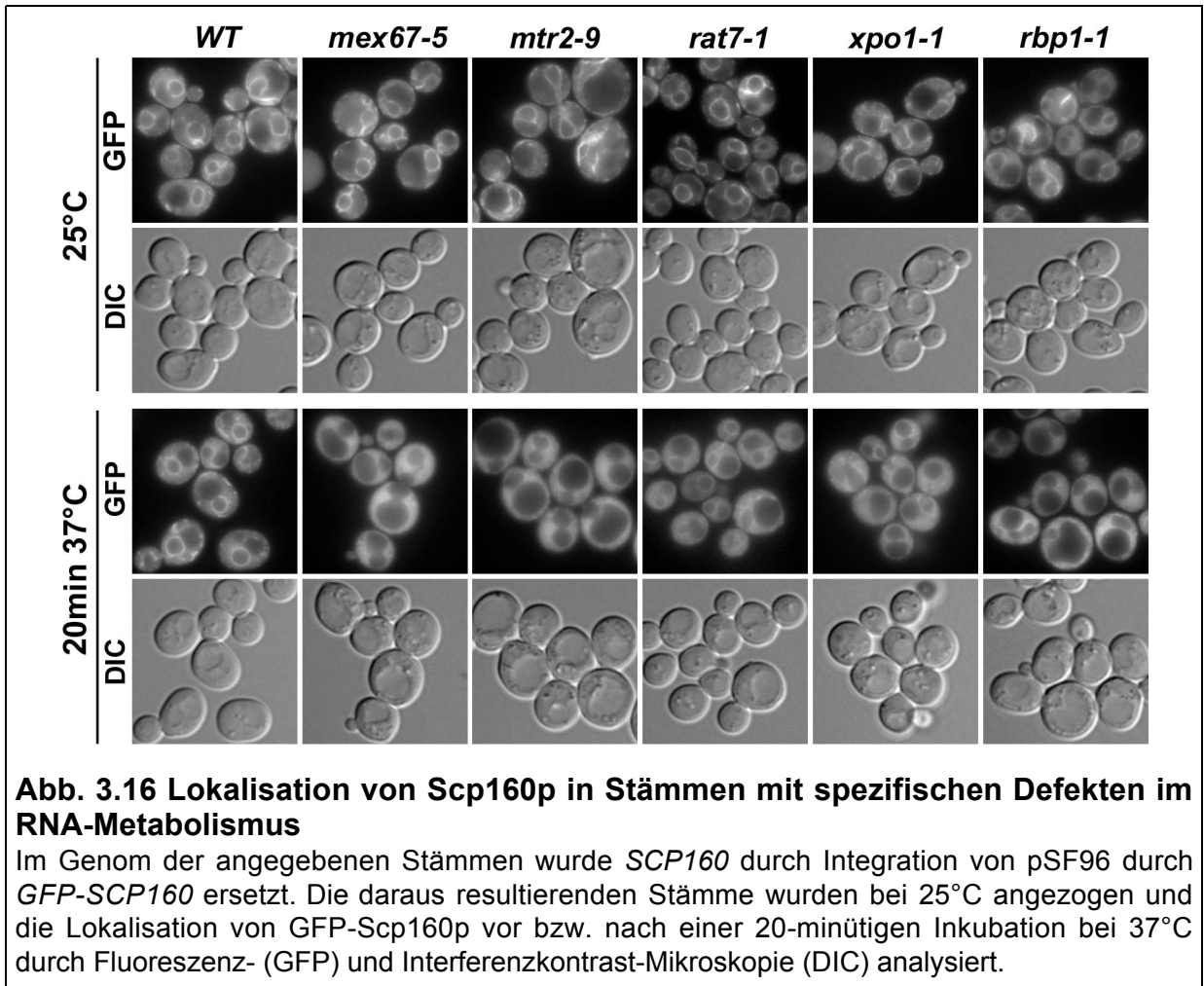
Der kleinen monomeren GTPase Ran kommt im Kerntransport eine zentrale Rolle zu. GTP-gebundenes Ran (Ran-GTP) liegt in hoher Konzentration im Zellkern, im Zytoplasma dagegen in geringer Konzentration vor. Der Gradient von Ran-GTP über die Kernmembran ist die treibende Kraft und maßgebend für die Direktionalität des Kerntransports (Görllich & Kutay, 1999; Izaurralde *et al.*, 1997). Die asymmetrische Verteilung von Ran-GTP wird durch die charakteristische Lokalisation des zytosolischen Ran-spezifischen GTPase aktivierenden Proteins (RanGAP) Rna1p sowie des nukleären Ran-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors (RanGEF) Prp20p aufrecht erhalten (Aebi *et al.*, 1990; Amberg *et al.*, 1993; Bischoff *et al.*, 1995; Hopper & Banks, 1978; Kadowaki *et al.*, 1993). Temperatursensitive (*ts*) Mutanten von RanGAP (*rna1-1*) und RanGEF (*prp20-1*) führen bei restriktiver Temperatur (37°C) durch Äquilibrierung des Ran-GTP-Gradienten zu einer Inhibition von Ran-abhängigem Kerntransport.

Die Ran-Abhängigkeit des Kernimports wurde durch Lokalisation von Scp160p(98-142)-2xGFP und SV40-NLS-2xGFP in *WT*-, *prp20-1^{ts}*- sowie *rna1-1^{ts}*-Zellen bei 25°C und 37°C untersucht. Bei 25°C ist in einem *WT*-Stamm sowie den temperatursensitiven Stämmen *prp20-1* und *rna1-1* sowohl Scp160p(98-142)-2xGFP als auch das Kontrollprotein SV40-NLS-2xGFP im Kern angereichert (Abb. 3.15 B). 10 Minuten Inkubation bei restriktiver Temperatur (37°C) führt in beiden *ts*-Stämmen, jedoch nicht im *WT*-Stamm, zu einem Verlust dieser Kernanreicherung und zu einer gleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzsignals zwischen Zellkern und Zytoplasma. Der Import von Scp160p(98-142)-2xGFP ist daher ebenso wie der des SV40-NLS-2xGFP-Kontrollkonstruktes abhängig von der Anwesenheit eines intakten Ran-GTP-Gradienten und wird folglich von einer Ran-abhängigen Maschinerie vermittelt.

3.2.2.4 Lokalisation von Scp160p in Stämmen mit spezifischen Defekten im RNA-Metabolismus

Unter optimalen Wachstumsbedingungen befindet sich der Großteil von Scp160p im Zytosol. Im Zellkern konnte das Protein mit mikroskopischen Techniken nicht eindeutig nachgewiesen werden. In den vorangehenden Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass Scp160p ein Kernimportsignal enthält, das den aktiven und Ran-abhängigen Import von C-terminal verkürzten Scp160p-Konstrukten vermittelt. Daher besteht die Möglichkeit, dass Scp160p ähnlich wie andere RNA-bindende Proteine (z.B. hnRNP A2 (Hoek *et al.*, 1998), Vera (Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998), ZBP-1 (Ross *et al.*, 1997), VgRBP60 (Cote *et al.*, 1999), She2p (Uetz *et al.*, 2000)) zwischen Zytoplasma und Zellkern pendelt und im Komplex mit spezifischen mRNAs aus dem Kern exportiert wird. Um zu untersuchen, ob die zytosolische Lokalisation von Scp160p eine Konsequenz eines effektiven Kernexports oder einer

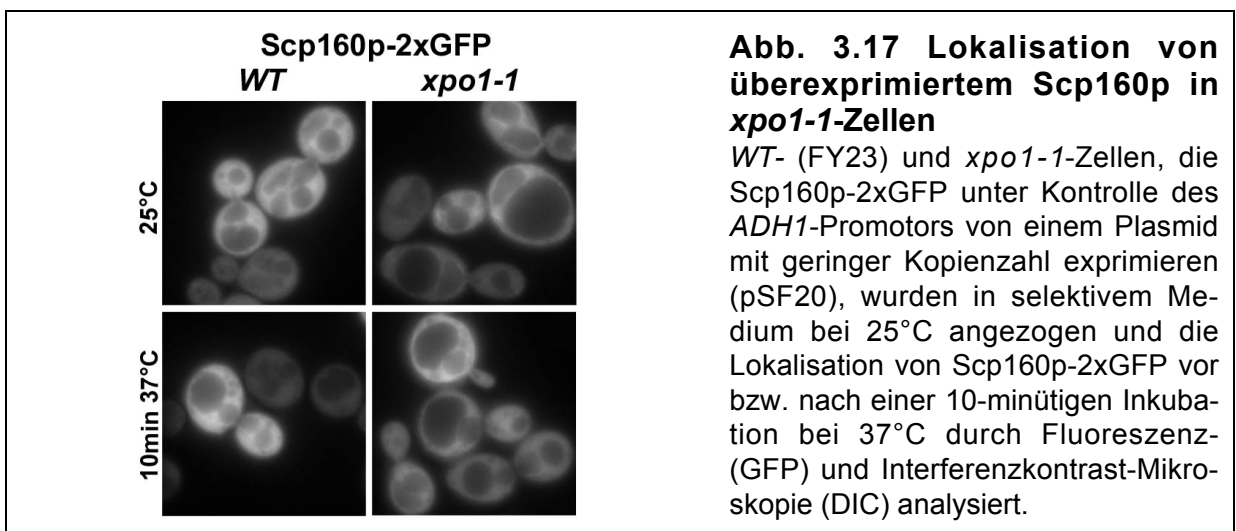
zytosolischen Retention ist, wurde die Lokalisation von GFP-Scp160p bei endogenem Expressionsniveau in Stämmen untersucht, die nach Inkubation bei restriktiver Temperatur (37°C) Defekte in Synthese oder Export von mRNA und/oder Proteinen aufweisen (Abb. 3.16).



Bei 25°C weist GFP-Scp160p in allen untersuchten Stämmen eine perinukleäre und kortikale Lokalisation auf (Abb. 3.16, obere Reihe; vgl. mit Abb. 3.1). Bei 37°C findet sich GFP-Scp160p in temperatursensitiven Stämmen mit spezifischen Defekten im Kernexport von mRNA (*mex67-5* (Hurt *et al.*, 2000), *mtr2-9* (Santos-Rosa *et al.*, 1998), *rat7-1* (Gorsch *et al.*, 1995)) ebenso wie in einem *ts*-Stamm mit Kernexport-Defekten für Proteine mit leucinreichem NES, ribosomalen Untereinheiten sowie mRNAs (*xpo1-1* (Stade *et al.*, 1997b)) oder in der *rpb1-1^{ts}*-Mutante mit defekter mRNA-Synthese (Nonet *et al.*, 1987) weitgehend diffus im Zytoplasma, wird jedoch nicht im Zellkern angereichert. Die Lokalisation von GFP-Scp160p ist im *WT*-Stamm bei 37°C ähnlich wie bei 25°C (Abb. 3.16, untere Reihe). Dies zeigt, dass Scp160p nicht mit RNA oder Proteinen aus dem Zellkern exportiert wird. Vielmehr legen diese Daten nahe, dass Scp160p unter den angewandten Bedingungen aufgrund einer

starken zytosolischen Retention oder einer Maskierung der Importaktivität nicht in den Zellkern gelangt (vgl. Diskussion). Allen in diesem Versuch untersuchten *ts*-Stämmen ist gemein, dass die Menge zytosolischer mRNA nach Inkubation bei restriktiver Temperatur verringert wird. Der gleichzeitige Verlust der membran-typischen Lokalisation von GFP-Scp160p zeigt daher konsistent mit den zuvor vorge-stellten biochemischen Daten, dass die Bindung von Scp160p an die ER-Membran *in vivo* von der Anwesenheit zytosolischer mRNA abhängt.

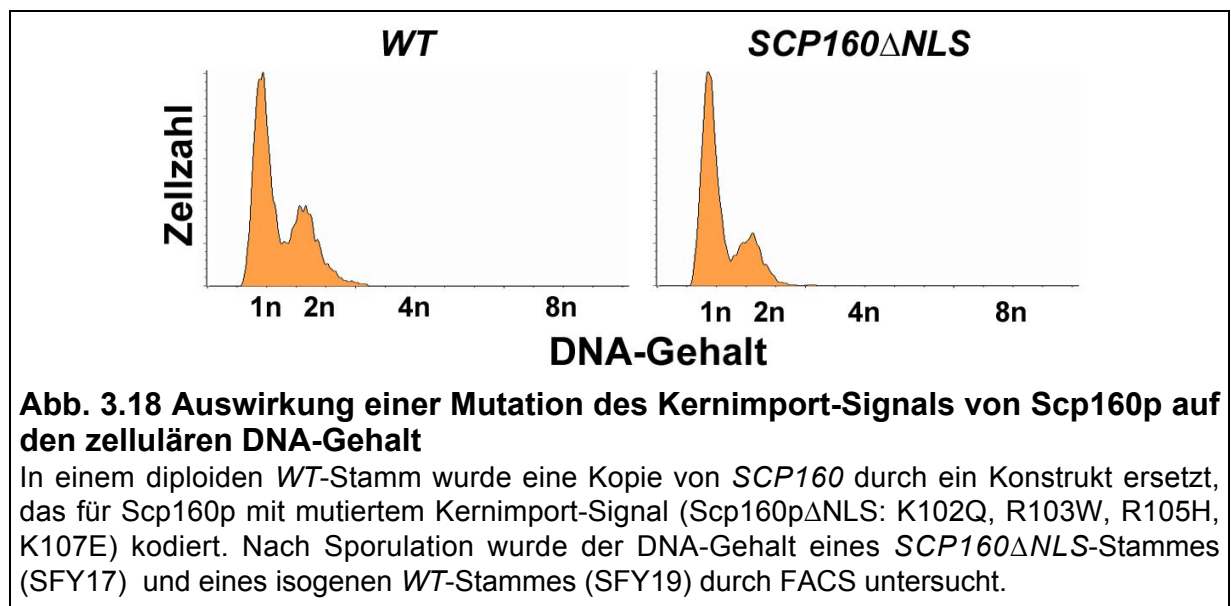
Um zu untersuchen ob Scp160p in einem polysomenfreien Zustand das Potential hat, in den Zellkern zu gelangen, wurde Scp160p-2xGFP in *WT*-Zellen und *xpo1-1*-Zellen unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors von einem Plasmid mit geringer Kopien-zahl exprimiert und die Zellen bei 25°C oder 37°C durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.



Die Überexpression von Scp160p-2xGFP im Verhältnis zum endogenen *WT*-Protein führt bei permissiver Temperatur zu einer Zunahme von Scp160p in einer ribosomen-freien Fraktion (Frey *et al.*, 2001) und zu einer gleichmäßigen Verteilung der GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma (Abb. 3.17 oben links; vgl. Abb. 3.13). Nur geringe Fluoreszenz ist in der Vakuole und im Zellkern zu erkennen. Nach Inkubation von *WT*- oder *xpo1-1*-Zellen bei 37°C für 10 Minuten bleibt diese Lokalisation bestehen. Insbesondere kann keine Zunahme der GFP-Fluoreszenz im Zellkern beobachtet werden (Abb. 3.17). Diese Daten zeigen, dass die Polysomenassoziation nicht allein ausschlaggebend für die zytoplasmatische Lokalisation von Scp160p ist.

3.2.2.5 Untersuchung der *in vivo*-Relevanz des Kernimport-Signals in den AS 98-142

Um die funktionelle Relevanz des Kernimport-Signals (AS 98-142) unter optimalen Wachstumsbedingungen zu untersuchen, wurde eine Kopie von *SCP160* im Genom diploider Hefen durch ein Konstrukt ersetzt, das für Scp160p mit einem mutierten Kernimport-Signal (Scp160p Δ NLS: K102Q, R103W, R105H, K107E) kodiert. Die eingeführten Mutationen zerstören die Kerntransportaktivität der charakterisierten Importdomäne (vgl. Abb. 3.16). Durch Sporulation wurde ein haploider *SCP160 Δ NLS*-Stamm sowie ein isogener *SCP160-WT*-Stamm erhalten. Beide Stämme wurden in YPD angezogen und der zelluläre DNA-Gehalt durch FACS analysiert.

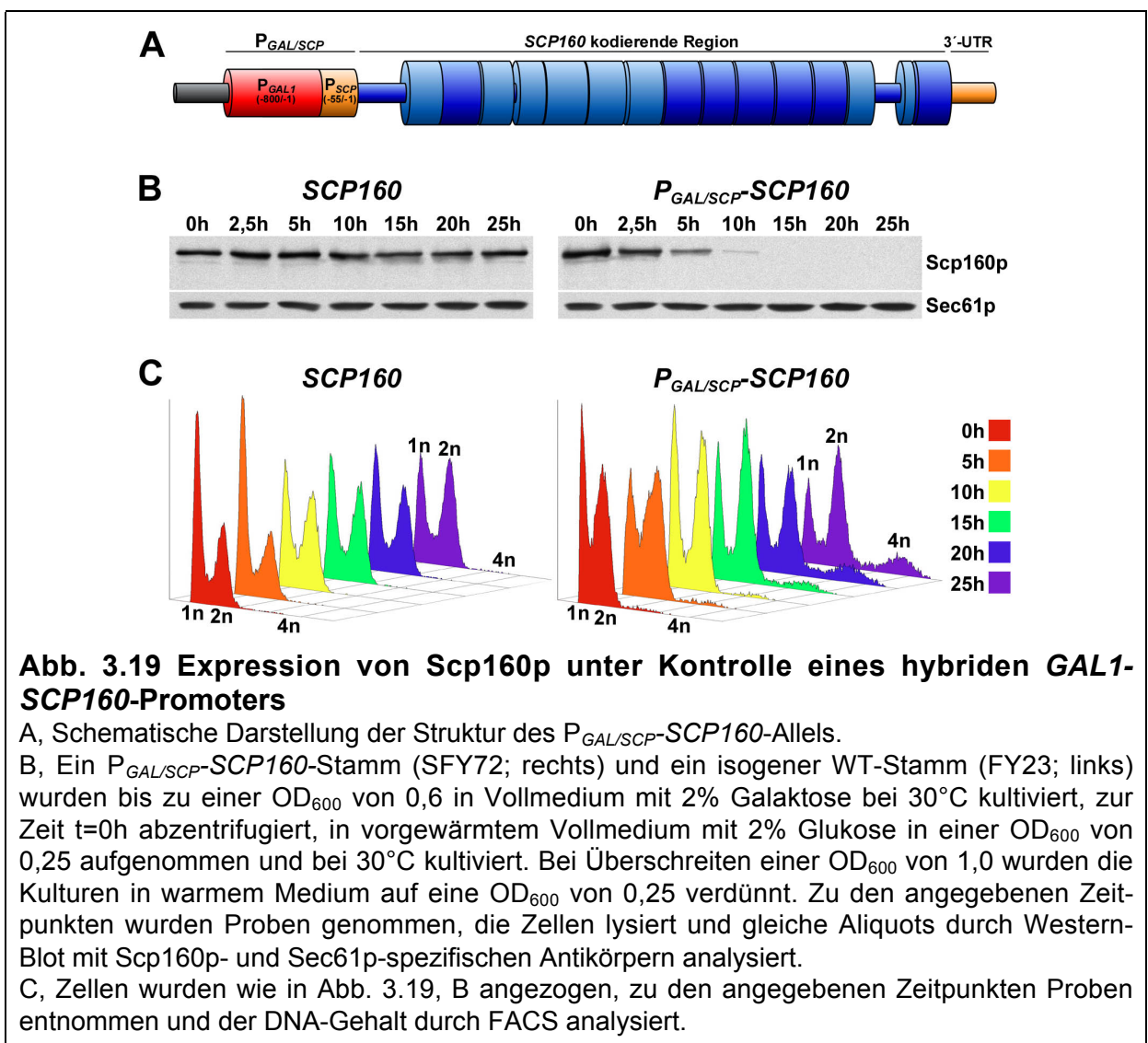


Sowohl der *SCP160 Δ NLS*-Stamm als auch der isogene *WT*-Stamm zeigen ein FACS-Profil mit Peaks bei 1n und 2n. Dies zeigt, dass beide Stämme einen haploiden Chromosomensatz aufweisen. Unter optimalen Wachstumsbedingungen wird daher die Funktionalität des Kernimport-Signals AS 98-142 nicht zur Komplementation einer Chromosomenverdopplung benötigt.

3.3 Einfluss von Scp160p auf den mRNA-Metabolismus

3.3.1 Expression von Scp160p unter Kontrolle eines hybriden *GAL1/SCP160*-Promotors

Deletion von *SCP160* führt nach mehreren Zellteilungen zu verschiedenen pleiotrophen Phänotypen wie einer Verdopplung des zellulären DNA-Gehalts, Vergrößerung der Zellen und einer anormalen Morphologie (Wintersberger *et al.*, 1995). Um die Auswirkungen eines Verlustes von Scp160p auf den RNA-Metabolismus unter weitgehender Vermeidung derartiger Phänotypen zu untersuchen, wurde ein System entwickelt, das erlaubt, die Expression von Scp160p zu einem definierten Zeitpunkt abzuschalten.



Durch Fusion von 800bp des Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotors mit einer Sequenz, die den 55bp stromaufwärts des *SCP160*-Startkodons entspricht, wird ein hybrider *GAL1/SCP160*-Promotor ($P_{GAL/SCP}$) erhalten. In einem haploiden *WT*-Stamm

wurde *SCP160* durch ein Konstrukt ersetzt, das erlaubt, Scp160p unter Kontrolle des *GAL1/SCP160*-Promotors zu exprimieren (Abb. 3.19 A). Zu definierten Zeitpunkten nach Transfer von galaktose- in glukosehaltiges Medium wurden die Scp160p-Menge sowie der DNA-Gehalt in Zellen eines *WT*- sowie eines *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stammes durch Western-Blot bzw. FACS untersucht.

In Medium mit 2% Galaktose bewirkt die Expression von Scp160p unter Kontrolle des *GAL1/SCP160*-Promotors eine der *WT*-Situation vergleichbare Expression von Scp160p (Abb. 3.19 B, 0h) und eine weitgehende Komplementation des Chromosomensegregationsdefektes der *scp160Δ*-Mutante (Abb. 3.19 C, 0h). Der Transfer eines *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stammes von galaktosehaltigem Medium in Medium mit 2% Glukose führt zur allmählichen Depletion von Scp160p. Nach 15 Stunden kann im Western-Blot kein Scp160p mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.19 B). Die Analyse des DNA-Gehaltes durch FACS zeigt, dass ein *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stamm erst nach etwa 20 Stunden Wachstum in glukosehaltigem Medium eine signifikante Zunahme des 4n-Peaks und damit von Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt zeigt (Abb. 3.19 C). 15 Stunden nach Beginn der Scp160p-Depletion können daher die Folgen eines Scp160p-Verlustes weitgehend ohne Beeinträchtigung durch sekundäre DNA-Verdopplungseffekte untersucht werden.

3.3.2 Einfluss von Scp160p auf das Transkriptom

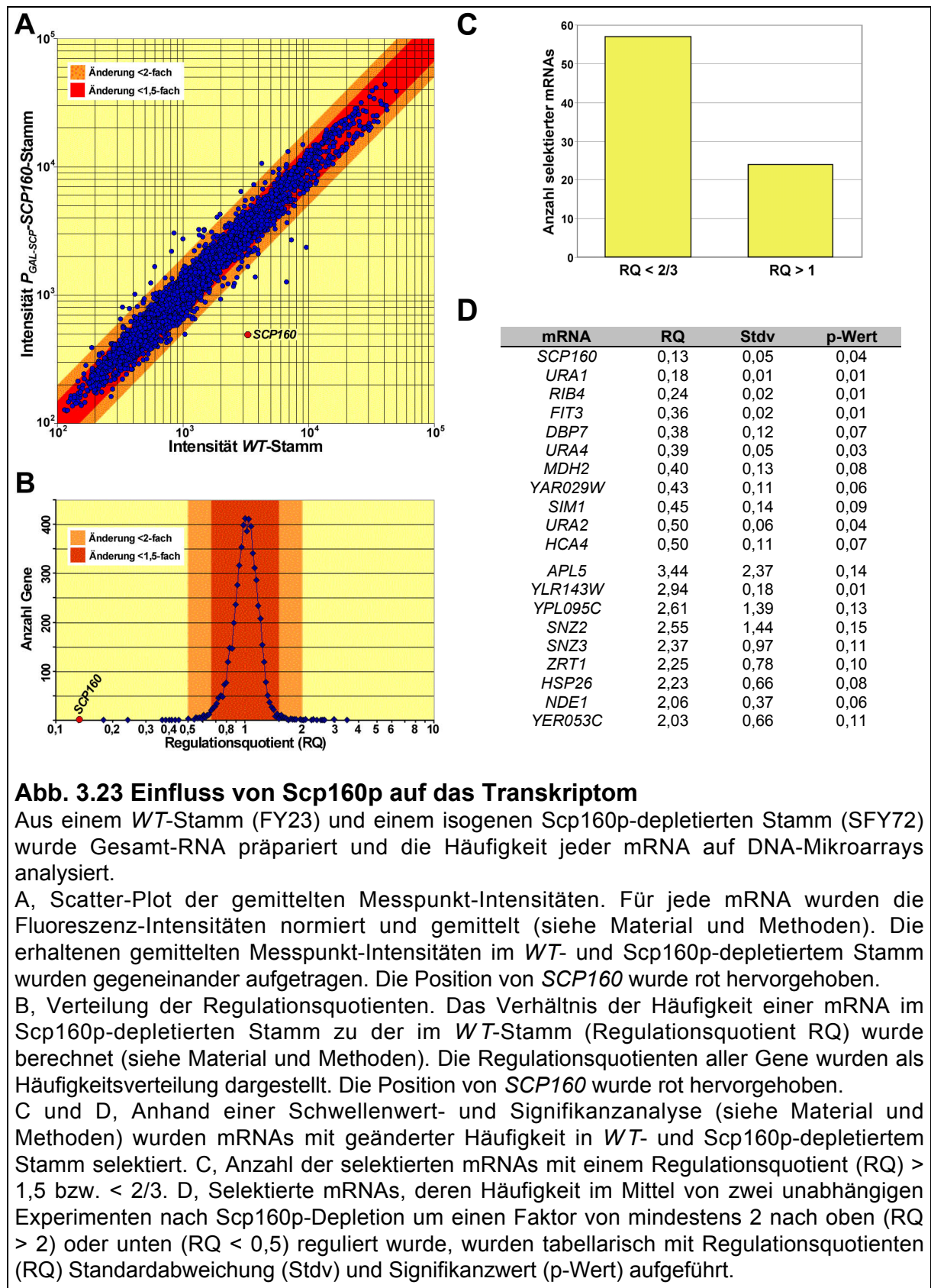
Die Auswirkungen einer Scp160p-Depletion auf den zellulären mRNA-Metabolismus wurden durch Vergleich der Häufigkeiten aller zellulären mRNAs (dem Transkriptom) in einem *WT*- und einem Scp160p-depletierten Stamm untersucht. Transkriptom-Änderungen können sowohl durch eine Veränderung der Transkriptionsrate und/oder der Stabilität spezifischer mRNAs zustande kommen (McCarthy, 1998). Zudem kann die Veränderung beider Parameter sowohl eine direkte Folge der Depletion von Scp160p als auch ein sekundärer Effekt, etwa eine Reaktion der Zelle auf die nach Depletion von Scp160p induzierten Veränderungen, sein. Damit ist mit diesem Ansatz *per se* keine Aussage darüber möglich, mit welchen mRNAs Scp160p direkt interagiert. Die Analyse der nach einem Verlust von Scp160p induzierten Veränderungen auf mRNA-Ebene kann jedoch zum Verständnis der Funktion von Scp160p beitragen.

In zwei unabhängigen Experimenten wurde Gesamt-RNA aus einem *WT*-Stamm und einem isogenen Scp160p-depletierten *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stamm präpariert. Die Häufigkeiten der unterschiedlichen mRNAs in diesen Präparationen wurde durch Analyse von auf cDNA-basierenden Glas-Mikroarrays ermittelt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die mittleren Signalintensitäten aller mRNAs im *WT*- und Scp160p-depletierten Stamm gegeneinander aufgetragen (Scatter-Blot Abb. 3.23 A). Aus dem Verhältnis der mittleren Signalintensitäten im Scp160p-depletierten

und im *WT*-Stamm wurden Regulationsquotienten ($RQ = \text{mittlere Signalintensität Scp160p-depletiert} / \text{WT}$) berechnet und die Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Regulationsquotienten ermittelt (Abb. 3.23 B). Aufgrund von Schwellenwert- und Stringenzkriterien wurden mRNAs selektiert, deren Häufigkeit sich im Scp160p-depletierten Stamm von der im *WT*-Stamm unterscheidet: Nur solche mRNAs wurden als geändert betrachtet, deren Häufigkeit sich nach Scp160p-Depletion im Mittel um einen Faktor von mindestens 1,5 ändert und deren Regulationsquotient in zwei unabhängigen Experimenten ähnliche Werte zeigt (Details siehe Methoden).

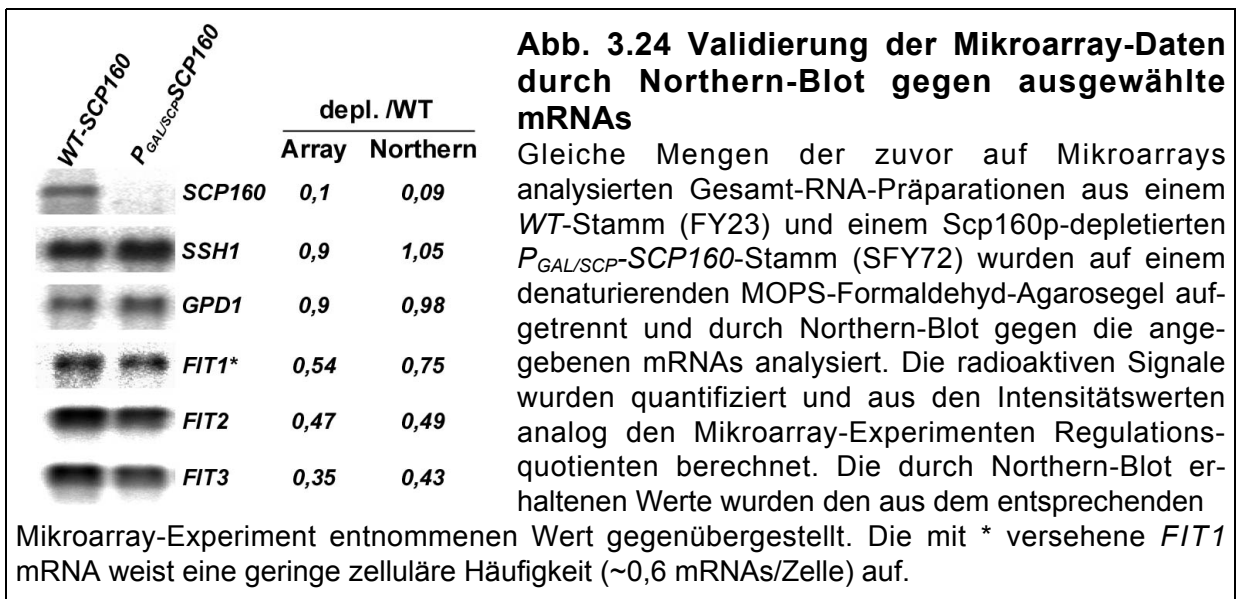
Mit einer nahezu 8-fachen Reduktion zeigt die *SCP160* mRNA im $P_{GAL/SCP-SCP160}$ -Stamm die stärkste Veränderung einer mRNA gegenüber dem *WT*-Stamm (Abb. 3.23 A, B, D). Diese Reduktion wurde anhand von Northern-Blot-Analysen verifiziert (vgl. Abb. 3.24) und ist ein Zeichen für die erfolgreiche Depletion von Scp160p. Änderungen im Transkriptom können daher auf eine Depletion von Scp160p zurückgeführt werden. Sowohl Scatter-Blot (Abb. 3.23 A) als auch die Häufigkeitsverteilung der Regulationsquotienten (Abb. 3.23 B) zeigen, dass die überwiegende Anzahl aller mRNAs sehr ähnliche Häufigkeiten im *WT*- und Scp160p-depletierten Stamm aufweisen: Mehr als 98% aller Datenpunkte befinden sich in den zentralen, rot unterlegten Bereichen der Schaubilder und zeigen eine weniger als 1,5-fache Änderung der mRNA-Häufigkeiten. Dagegen weist die Position von weniger als 2% der Datenpunkte auf eine mehr als 1,5-fache Änderungen der mRNA-Häufigkeit hin. Im Scatter-Blot (Abb. 3.23 A) ist die Streuung aller Datenpunkte um die Diagonale über den gesamten Intensitätsbereich sehr ähnlich. Damit ist eine technisch begründete bevorzugte Selektion von mRNAs mit besonders hoher oder besonders niedriger Signalintensität unwahrscheinlich. 81 mRNAs wurden selektiert, deren Häufigkeit sich im Scp160p-depletierten Stamm von der im *WT*-Stamm unterscheidet. Davon zeigen 57 nach Depletion von Scp160p eine verringerte, 24 eine erhöhte Häufigkeit (Abb. 3.23 C). Abb. 3.23 D zeigt eine Auswahl von mRNAs, deren Häufigkeit sich nach Depletion von Scp160p um einen Faktor von mindestens zwei ändert. Die Selektion von der *URA1*, 2 und 4 mRNAs sind möglicherweise auf die unterschiedliche Ausstattung der untersuchten Stämme mit genetischen Markern zurückzuführen.

Selektierte mRNAs wurden anhand einer Datenbank des Munich Information Center for Protein Sequences MIPS (Mewes *et al.*, 2002a; b) sowie der SGD (Cherry, 2002) in Gruppen bezüglich der Lokalisation der kodierten Proteine eingeteilt. 53 der selektierten 81 mRNAs sind in den Datenbanken enthalten.



Innerhalb dieser Gruppe kodieren 28 mRNAs für Proteine, die in den sekretorischen Weg eingehen. 11 dieser mRNAs kodieren für Zellwand- und extrazelluläre Proteine, 6 mRNAs für Plasmamembran-Proteine. mRNAs, die für Proteine kodieren, die in

den sekretorischen Weg eingehen, sind damit innerhalb der selektierten mRNAs signifikant überrepräsentiert, andere mRNAs unterrepräsentiert (nicht gezeigt). Die Verlässlichkeit der erhaltenen Regulationsquotienten wurde durch Northern-Blot-Analyse von exemplarisch ausgesuchten mRNAs überprüft. Dazu wurden die zuvor auf Mikroarrays untersuchten Gesamt-RNA-Präparationen aus einem *WT*-Stamm und einem Scp160p-depletierten *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stamm durch Northern-Blot mit radioaktiv markierten Sonden gegen die *SCP160*-, *SSH1*-, *GPD1*-, *FIT1*-, *FIT2*- und *FIT3*-mRNAs analysiert (Abb. 3.24). Aus den Signalen wurden analog den Mikroarray-Experimenten Regulationsquotienten (mRNA-Häufigkeit Scp160p-depletiert/*WT*) berechnet.



Die Northern-Blots (Abb. 3.24) zeigen für die *SCP160* mRNA eine starke Reduktion des Signals im Scp160p-depletierten Stamm im Vergleich zum *WT*-Stamm. Die Signale der *SSH1* mRNA sowie der *GPD1* mRNA sind dagegen in beiden Stämmen sehr ähnlich. Die *FIT1*, *FIT2*, *FIT3* mRNAs zeigen nach Scp160p-Depletion ein im Vergleich zum *WT*-Stamm um einen Faktor 2 (*FIT1*, 2) bzw. 3 (*FIT3*) reduziertes Signal. Eine Gegenüberstellung der durch Northern-Blot und durch Analyse des entsprechenden Mikroarrays erhaltenen Regulationsquotienten (Abb. 3.24) zeigt, dass mit Ausnahme der sehr niedrig abundanten *FIT1*-mRNA (ca. 0,6 mRNAs/Zelle) die mit beiden Techniken erhaltenen Werte gut übereinstimmen.

Der durchgeführte Versuch zeigt, dass nach Depletion von Scp160p nur wenige mRNAs eine veränderte Häufigkeit zeigen. Scp160p ist daher kein genereller Transkriptions- oder mRNA-Stabilitätsfaktor. Innerhalb der Gruppe der mRNAs, die nach Scp160p-Depletion eine veränderte Häufigkeit aufweisen, sind mRNAs überrepräsentiert, die für Proteine kodieren, die in den sekretorischen Weg eingehen.

3.3.3 Einfluss von Scp160p auf mRNAs in einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion

Scp160p bindet bevorzugt an eine Subfraktion membrangebundener Polysomen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, dass Scp160p einen selektiven Einfluss auf eine spezifische Gruppe membranassoziierter mRNAs ausübt. Im folgenden Versuch wurde daher anhand von Mikroarray-Experimenten untersucht, ob Depletion von Scp160p Auswirkungen auf die Verteilung spezifischer mRNAs zwischen einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion hat.

Durch differentielle Zentrifugation können in Hefe mRNAs, die an Membranen angereichert sind, von zytosolischen mRNAs getrennt werden (Diehn *et al.*, 2000; Stoltenburg *et al.*, 1995). Nach Optimierung der beschriebenen Technik bezüglich der Stabilisierung von mRNA während der Aufarbeitung wurden in zwei unabhängigen Experimenten aus Gesamt-Lysaten von *WT*- und Scp160p-depletierten Zellen eine membranangereicherte Fraktion (P10) sowie eine zytosolische Fraktion (S25) präpariert. Die so erhaltene membranangereicherte Fraktion enthält den überwiegenden Teil der ER-Membranen, Mitochondrien, Kernfragmente sowie Bruchstücke der Zellwand, die zytosolische Fraktion ist dagegen weitgehend frei von den genannten membranhaltigen Kompartimenten. Aus allen Fraktionen wurde Gesamt-RNA präpariert und die Integrität und Verteilung der isolierten mRNA exemplarisch durch Northern-Blot mit Sonden gegen die *GPD1* und *ERG11* mRNAs untersucht (Abb. 3.25). *GPD1* kodiert für das zytosolische Protein Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, *ERG11* für das integrale ER-Protein Lanosterol-14-alpha-Demethylase.

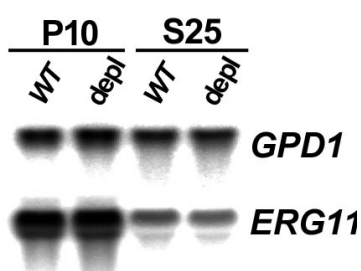


Abb. 3.25 Überprüfung der Qualität und Verteilung spezifischer mRNAs nach Zellfraktionierung

Aus Gesamtlisat von *WT*- (FY23; *WT*) und Scp160p-depletierten Zellen (SFY72; *depl*) wurden durch differentielle Zentrifugation eine membranangereicherte Fraktion (P10) und eine membranfreie Fraktion (S25) erhalten. Aus allen Fraktionen wurde Gesamt-RNA präpariert. Gleiche

Mengen Gesamt-RNA jeder Fraktion wurden auf einem denaturierenden MOPS-Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die Integrität der isolierten mRNA sowie ihre Verteilung zwischen den Fraktionen wurde exemplarisch durch Northern-Blot mit radioaktiven Sonden gegen die *GPD1* und *ERG11* mRNAs untersucht, die für ein zytosolisches Protein bzw. ein integrales ER-Membranprotein kodieren.

Der Northern-Blot (Abb. 3.25) zeigt für alle untersuchten mRNAs Banden mit über 90% des Signals in der Hauptbande. Während die *GPD1* mRNA sowohl im *WT*- wie im Scp160p-depletierten Stamm (*depl*) in der membranangereicherten (P10) und der

zytosolischen Fraktion (S25) eine gleiche Signalstärke zeigt, ist die *ERG11* mRNA in beiden Stämmen gleichermaßen in P10 angereichert (Abb. 3.25). Diese Verteilung deckt sich mit veröffentlichten Ergebnisse einer anderen Gruppe (Diehn *et al.*, 2000). Die RNA-Präparationen wurden daher für weitere Analysen auf Mikroarrays eingesetzt.

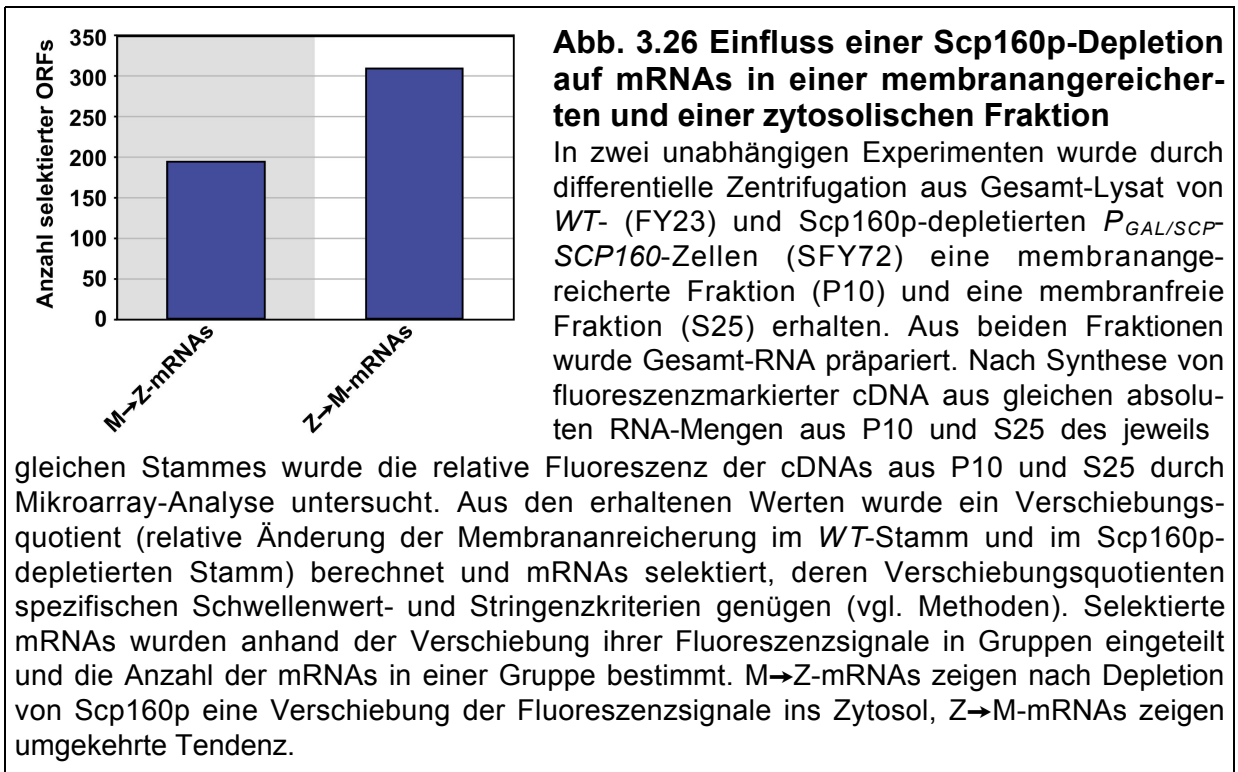
Von gleichen absoluten Gesamt-RNA-Mengen aus P10 und S25 beider Stämme wurde fluoreszenzmarkierte cDNA synthetisiert und die relative Menge synthetisierter cDNA durch Mikroarray-Analyse bestimmt. Da die aus gleichen Ausgangsmengen isolierte Gesamt-RNA in der zytosolischen Fraktion etwa fünffach größer ist als in der membranangereicherten Fraktion, repräsentieren die erhaltenen Werte keine absolute Verteilung von mRNAs innerhalb der Zelle sondern sind ein Maß für synthetisierte cDNA in Relation zur Gesamt-RNA in dieser Fraktion.

Alle Mikroarrays lieferten Signale guter Qualität mit einer großen Spanne unterschiedlicher Messpunkt-Intensitäten. Dies ist ein Hinweis auf eine erfolgreiche Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA und neben den durchgeführten Northern-Blots ein weiteres Indiz auf einen guten Zustand der eingesetzten RNA-Präparationen. Eine große Anzahl von Messpunkten auf jedem Array weist starke Signalunterschiede zwischen der membranangereicherten und der zytosolischen Fraktion auf. Dies deutet auf eine erfolgreiche Auftrennung membranassoziierter und zytosolischer mRNAs hin.

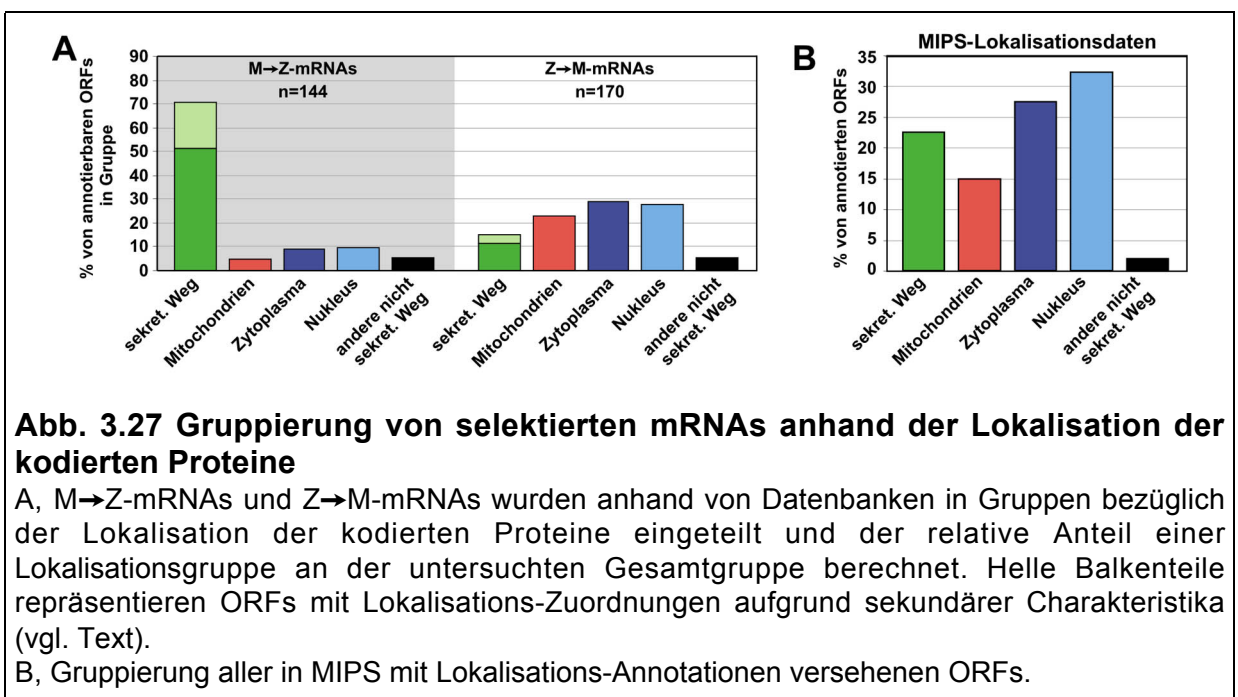
3.3.3.1 Selektion und Gruppierung Scp160p-abhängiger mRNAs

Zur Auswertung der Mikroarrays wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von cDNAs, die aus der membranangereicherten Fraktion P10 und der zytosolischen Fraktion S25 synthetisiert wurden, berechnet. Dieses wird im Folgenden als **Membrananreicherung** (MA) bezeichnet. Aus diesen Werten wurde ein **Verschiebungsquotient** (VQ) errechnet, der dem Verhältnis der relativen Membrananreicherungen im Scp160p-depletierten und im *WT*-Stamm entspricht. Aufgrund von Schwellenwert- und Stringenzkriterien ($VQ < 2/3$ oder $VQ > 1,5$; geringe Abweichung zwischen zwei unabhängigen Experimenten; vgl. Methoden) wurden mRNAs selektiert, deren Membrananreicherungen sich im *WT*-Stamm und Scp160p-depletierten Stamm unterscheiden.

507 (8%) aller analysierten offenen Leseraster (ORFs) in Hefe zeigen eine reproduzierbare Scp160p-abhängige Signalverschiebung zwischen membranangereicherter und zytosolischer Fraktion. Davon weisen 196 nach Scp160p-Depletion eine relative Verschiebung der Fluoreszenzsignale von der membranangereicherten Fraktion ins Zytosol auf (***M*→*Z*-mRNAs**), die übrigen 311 mRNAs zeigen einen gegenläufigen Effekt (***Z*→*M*-mRNAs**, Abb. 3.26).



Selektierte ORFs wurden mit Hilfe der im Internet zugänglichen Datenbanken MIPS (Mewes *et al.*, 2002a; b) und SGD (Cherry, 2002) mit Informationen bezüglich der Lokalisation und Funktion der kodierten Proteine verknüpft. Soweit möglich wurden nicht mit Lokalisationsdaten versehene ORFs anhand der Anzahl kodierter potentieller Transmembran-Domänen (TM) oder einer bekannten Funktion des kodierten Proteins ebenfalls in Lokalisations-Klassen eingeteilt (Abb. 3.27 A).



Von den 314 so einteilbaren ORFs entsprechen 144 M→Z-mRNAs, die verbleibenden 170 ORFs sind Z→M-mRNAs. Die getrennte Analyse der relativen Anteile von selektierten mRNAs, die für Proteine in verschiedenen Lokalisationsgruppen kodieren, zeigt in beiden Gruppen große Unterschiede: Insbesondere mRNAs, die für Proteine kodieren, die sicher oder potentiell in den sekretorischen Weg eingehen (dunkelgrüner bzw. hellgrüner Balken) sind in der Gruppe der M→Z-mRNAs mit über 70% aller ORFs deutlich stärker vertreten als in der Vergleichsgruppe (16%). Der Vergleich mit einer ähnlichen Zusammenstellung aller mit MIPS-Lokalisations-Annotationen (Mewes *et al.*, 2002a) versehenen ORFs (Abb. 3.27 B) zeigt, dass sekretorische ORFs auch absolut in der Gruppe der selektierten M→Z-mRNAs überrepräsentiert, in der Referenzgruppe der Z→M-mRNAs dagegen unterrepräsentiert sind. In Tabelle 3.1 sind mRNAs, deren Membrananreicherungen sich nach Depletion von Scp160p am stärksten von der *WT*-Situation unterscheiden, zusammengestellt.

Eine detailliertere Betrachtung beider Untergruppen selektierter mRNAs zeigt, dass sich beide Gruppen durch unterschiedliche Eigenschaften der kodierten Proteine auszeichnen: Proteine, die von M→Z-mRNAs kodiert werden und in den sekretorischen Weg eingehen, haben bevorzugt eine Funktion beim Auf-, Ab- oder Umbau der Zellwand, bei der Glykosylierung oder der Synthese von GPI-Ankern sowie bei Transportprozessen in der Plasmamembran und der Vakuole. In dieser Gruppe sind GPI-verankerte Zellwand-Proteine, integrale Plasmamembran-Proteine und Unter-einheiten von Multi-Protein-Komplexen stark vertreten. Im Gegensatz dazu spielen Proteine, die von Z→M-mRNAs kodiert werden und in den sekretorischen Weg eingehen, bevorzugt eine Rolle bei der Erleichterung und Funktion von Sekretion und Glykosylierung, der Kontrolle der Zellwand-Integrität und der Erleichterung der Bildung von Multi-Proteinkomplexen mit Transmembran-Komponenten.

Auch mitochondriale Proteine, die von selektierten M→Z- oder Z→M-mRNAs kodiert werden, weisen in beiden Untergruppen unterschiedliche Funktionen auf: M→Z-mRNAs mit mitochondrialer Funktion kodieren gehäuft für mitochondriale Membranproteine und Transporter, jedoch kaum für lösliche mitochondriale Proteine. In der entsprechenden Z→M-Vergleichsgruppe kodiert die überwiegende Mehrzahl der mRNAs dagegen für lösliche mitochondriale Proteine, die vorwiegend an der *effizienten Gestaltung* des mitochondrialen Proteinstoffwechsels beteiligt sind. Hier finden sich beispielsweise die mRNAs für mitochondriale ribosomale Proteine, Importrezeptoren und Mitochondrien-Biogenesefaktoren, Translationsfaktoren und –Aktivatoren, Chaperone und Chaperonine sowie Faktoren, die an der Assemblierung wichtiger mitochondrieller Multiprotein-Komplexe (F_1F_0 -ATPase, CytochromC-Oxidase) beteiligt sind.

Tabelle 3.1 Auswahl selektierter mRNAs

mRNA	MA (WT)	MA (depl)	VQ	P- Wert	Lokalisation	TM	Funktion des kodierten Proteins
<i>GAS5</i>	6,6	1,9	0,29	0,04	Plasmamembran? GPI?	0	ähnelt stark Gas1p
<i>YCR061W</i>	5,4	1,7	0,31	0,04	Membran?	9	ähnlich YTP1
<i>SCW4</i>	6,0	1,9	0,32	0,01	Zellwand	1	Ähnlichkeit zu Glukanasen
<i>GAS1</i>	6,0	2,0	0,32	0,07	Plasmamembran, GPI	1	GPI-verankertes Protein
<i>CTS1</i>	4,5	1,5	0,35	0,03	Zellwand	1	Endochitinase
<i>PTR2</i>	1,5	0,6	0,35	0,09	Plasmamembran	9	Peptidtransporter
<i>TOS1</i>	5,5	1,9	0,36	0,07	GPI?	1	nicht bekannt
<i>NEW1</i>	1,4	0,5	0,36	0,06	Zellkern	0	ähnlich eEF3
<i>CDC91</i>	3,2	1,1	0,37	0,02	sekretiert?	8	Kontrolle der Zellteilung
<i>PMT1</i>	4,6	1,7	0,37	0,03	ER-Membran	9	Protein- Mannosyl-Transferase
<i>AGA1</i>	5,9	2,2	0,38	0,10	Plasmamembran, Zellwand, GPI?	2	α -Agglutinin-Untereinheit
<i>PFK1</i>	1,2	0,4	0,38	0,09	Zytoplasma	0	Glykolyse
<i>GLY1</i>	0,7	0,3	0,39	0,03	nicht bekannt	1	L-Threonin Aldolase
<i>GPI7</i>	3,3	1,3	0,39	0,06	ER?	9	GPI-Anker-Synthese
<i>FUN26</i>	2,4	0,9	0,39	0,07	Plasmamembran	9	Nukleosid-Transport
<i>YNL190W</i>	4,8	2,0	0,39	0,08	GPI?	1	nicht bekannt
<i>GPI13</i>	4,0	1,6	0,40	0,08	ER-Membran	15	GPI-Anker-Synthese
<i>YOL155C</i>	5,2	2,1	0,40	0,02	Zellwand? GPI?	1	Ähnlichkeit zu Glukanasen
<i>SIM1</i>	6,4	2,5	0,40	0,07	Zellwand	1	Zellzyklus-Regulation
<i>HTL1</i>	0,9	2,5	2,80	0,08	nicht bekannt	0	DNA-Replikation?
<i>YDR391C</i>	0,4	0,9	2,51	0,05	nicht bekannt	0	nicht bekannt
<i>YGR165W</i>	1,1	2,7	2,46	0,03	nicht bekannt	0	nicht bekannt
<i>MRPL7</i>	1,0	2,3	2,41	0,03	mitochondrielle Matrix	0	mitochondriales ribosomales Protein
<i>MRPS9</i>	0,9	2,0	2,31	0,06	mitochondrielle Matrix	0	mitochondriales ribosomales Protein
<i>YEL033W</i>	0,4	0,8	2,31	0,02	nicht bekannt	2	nicht bekannt
<i>HTA2</i>	0,4	0,5	2,30	0,06	Zellkern	0	Histon H2A.2
<i>PBI2</i>	0,3	0,7	2,26	0,03	Zytoplasma	0	Vakuolenfusion
<i>RPL23B</i>	0,4	0,8	2,18	0,05	Zytoplasma	0	ribosomales Protein
<i>RPL25</i>	0,3	0,6	2,15	0,05	Zytoplasma	0	ribosomales Protein
<i>RPL11B</i>	0,3	0,6	2,13	0,09	Zytoplasma	0	ribosomales Protein
<i>RPL34A</i>	0,3	0,6	2,13	0,08	Zytoplasma	0	ribosomales Protein
<i>MET28</i>	0,7	1,0	2,10	0,07	Zellkern	0	Transkriptionsfaktor
<i>RPS12</i>	0,3	0,6	2,07	0,08	Zytoplasma	0	ribosomales Protein
<i>HTA1</i>	0,4	0,8	2,07	0,03	Zellkern	0	Histon H2A
<i>RSM10</i>	0,5	1,0	2,07	0,07	mitochondrielle Matrix	0	mitochondriales ribosomales Protein
<i>CHA1</i>	1,4	3,0	2,07	0,08	nicht bekannt.	1	L-Serin/L-Threonin Deaminase
<i>SBP1</i>	0,6	0,9	2,05	0,01	Zellkern	0	RNA-Prozessierung
<i>RPL32</i>	0,3	0,5	2,03	0,03	Zytoplasma	0	ribosomales Protein
<i>MRPL17</i>	0,7	1,5	2,01	0,02	mitochondrielle Matrix	0	mitochondriales ribosomales Protein
<i>ATP4</i>	1,1	2,1	2,01	0,01	innere Mitochondrien-Membran	1	ATP-Synthese, F ₁ F ₀ -ATPase-UE
<i>MRPL24</i>	0,8	1,6	2,00	0,02	mitochondrielle Matrix	0	mitochondriales ribosomales Protein
<i>MSS116</i>	1,7	3,4	2,00	0,10	mitochondrielle Matrix	1	mitochondrielle RNA Helikase

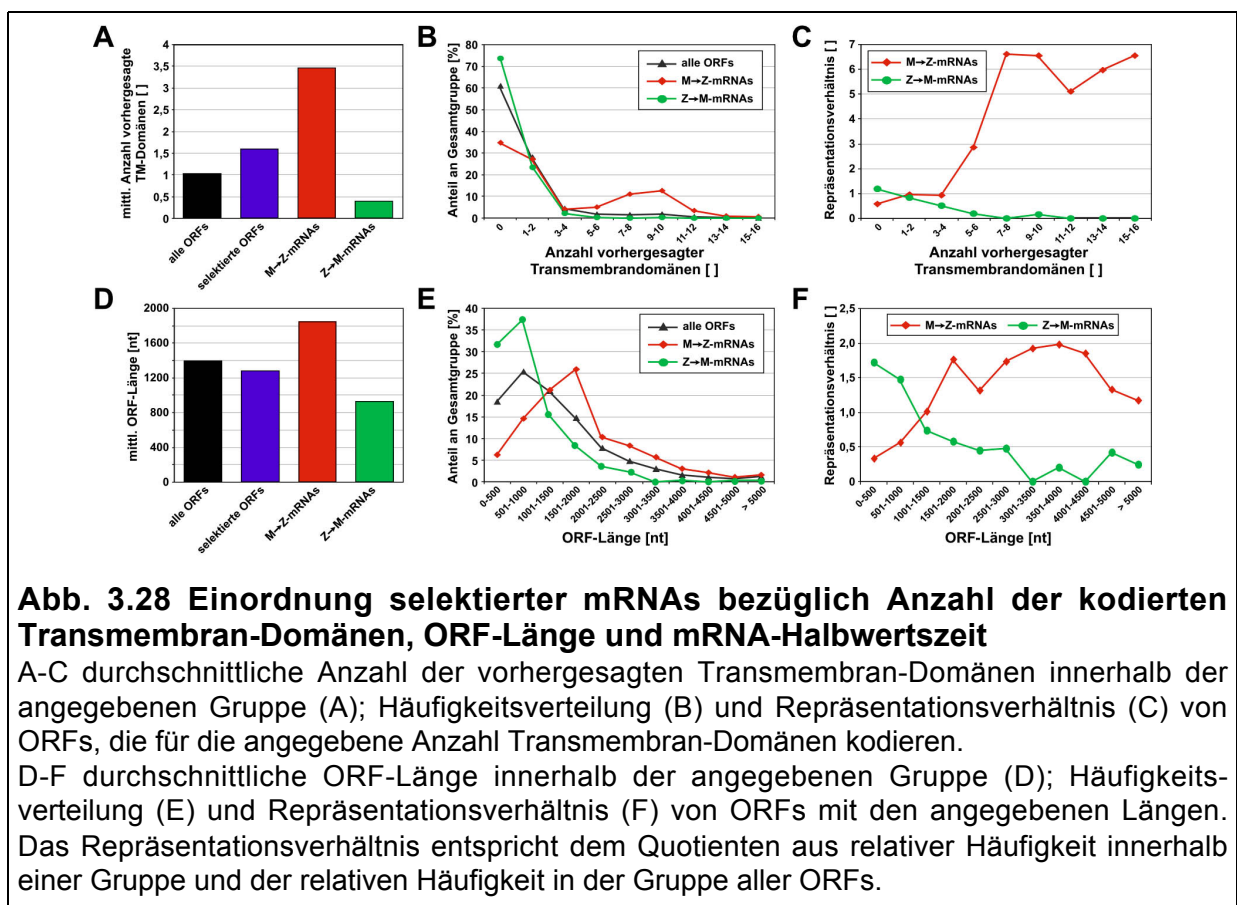
Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

?: nicht experimentell bestätigt; depl: nach Depletion von Scp160p; GPI: GPI-Anker; MA: Membran-anreicherung; TM: Anzahl der vorhergesagten Transmembran-Domänen; VQ: Verschiebungsquotient

Anhand der Datenbanken MIPS (Mewes *et al.*, 2002a; b) und SGD (Cherry, 2002) wurden die Anzahl der kodierten Transmembran-Domänen sowie die ORF-Länge selektierter mRNAs gemeinsam oder getrennt nach Gruppen (M→Z-mRNAs und Z→M-mRNAs) mit entsprechenden Eigenschaften aller potentiellen Proteine und ORFs im Hefegenom verglichen (Abb. 3.28). Zur Veranschaulichung wurden die durchschnittlichen Werte innerhalb der einzelnen Gruppen (Abb. 3.28 A, D) sowie die Verteilung der selektierten mRNAs einer Gruppe auf Klassen mit unterschiedlichen TM-Domänen (Abb. 3.28 B) oder ORF-Längen (Abb. 3.28 E) ermittelt. Durch Vergleich der erhaltenen Verteilungskurven selektierter mRNA-Gruppen mit den entsprechenden Verteilungskurven aller ORFs wurde untersucht, ob bestimmte

Klassen innerhalb der selektierten mRNAs über- oder unterrepräsentiert sind (Abb. 3.28 C und F).

Eine derartige Analyse zeigt, dass M→Z-mRNAs für Proteine mit überdurchschnittlich vielen Transmembran-Domänen kodieren (Abb. 3.28 A, roter Balken). Z→M-mRNAs zeichnen sich dagegen durch eine gegenüber dem Durchschnitt aller ORFs verringerte Anzahl kodierter TM-Domänen aus (Abb. 3.28 A, grüner Balken). Die Verteilung der selektierten mRNAs auf Gruppen mit unterschiedlicher Anzahl kodierter TM-Domänen macht deutlich, dass M→Z-mRNAs zu einem hohen Anteil für Proteine mit über vier TM-Domänen kodieren (Abb. 3.28 B, rote Kurve). Ein direkter Vergleich mit einer entsprechenden Verteilung aller ORFs im Hefegenom zeigt in der Tat, dass mRNAs, die für Proteine mit über vier TM-Domänen kodieren, in der Gruppe der selektierten M→Z-mRNAs gegenüber dem Gesamtproteom durchschnittlich etwa 5-fach überrepräsentiert sind (Abb. 3.28 C). In der Gruppe der Z→M-mRNAs sind entsprechende Klassen dagegen unterrepräsentiert. Depletion von Scp160p führt demnach zu einer bevorzugten Verringerung der Membranreicherung von mRNAs, die für Proteine mit vielen Transmembran-Domänen kodieren.



Eine ähnliche Analyse der Länge des offenen Leserasters (ORF) der selektierten mRNAs (Abb. 3.28 D-F) zeigt, dass M→Z-mRNAs überdurchschnittlich häufig für große Proteine, Z→M-mRNAs dagegen vermehrt für kleine Proteine kodieren.

Die Ergebnisse dieser Mikroarray-Versuche legen nahe, dass Scp160p einen selektiven Einfluss auf spezifische mRNAs ausübt. Depletion von Scp160p führt bei diesen mRNAs zu einer Verschiebung der beobachteten Fluoreszenzintensitäten zwischen membranangereicherter Fraktion und Zytosol.

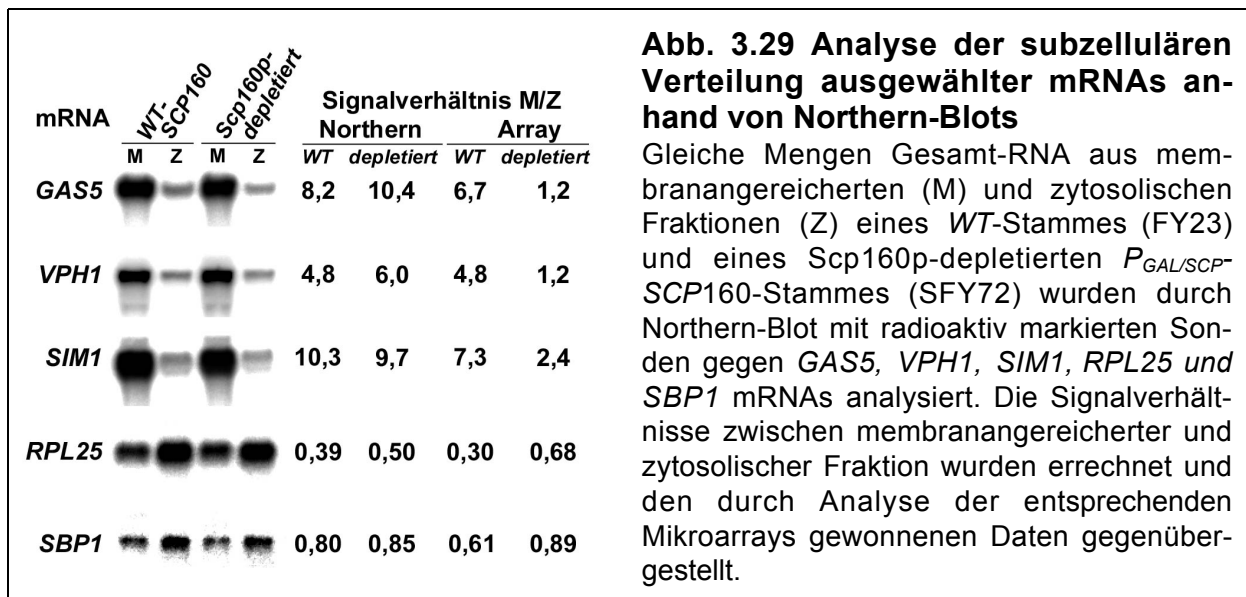
Die durch Scp160p-Depletion beeinflussten mRNAs können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die sich durch den Grad ihrer Membrananreicherung, die Richtung der Signalverschiebung nach Scp160p-Depletion, der Lokalisation, Funktion und Größe der kodierten Proteine sowie der Anzahl der kodierten Transmembran-Domänen unterscheiden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Charakteristika von M→Z- bzw. Z→M-mRNAs

Kriterium	M→Z-mRNAs	Z→M-mRNAs
Signalverschiebung nach Depletion von Scp160p	Membran → Zytosol	Zytosol → Membran
vorrangige Lokalisation der kodierten Proteine	Zellwand Plasmamembran ER, Vakuole	Zytosol Mitochondrien Nukleus
vorrangige Funktion der kodierten Proteine	Glykosylierung GPI-Anker-Synthese, Zellwandbiogenese Transportprozesse	Zellwand-Integrität Erleichterung von Sekretionsvorgängen Effizienz des Proteinstoffwechsels
Anzahl TM-Domänen	über Durchschnitt	unter Durchschnitt
ORF-Länge	über Durchschnitt	unter Durchschnitt

3.3.3.2 Überprüfung der Mikroarray-Daten durch Northern-Blot

Die Verlässlichkeit der durch Mikroarray-Analyse erhaltenen Daten wurde durch Northern-Blot überprüft. Dazu wurden die in zwei unabhängigen Experimenten erhaltenen und zuvor auf Mikroarrays untersuchten RNA-Präparationen durch Northern-Blot mit radioaktiv markierten Sonden gegen die M→Z-mRNAs *GAS5*, *VPH1*, *SIM1* sowie die Z→M-mRNAs *RPL25* und *SBP1* analysiert (Abb. 3.29). *GAS5*, *VPH1* und *SIM1* kodieren für Plasmamembran-, vakuoläre bzw. Zellwand-Proteine, Rpl25p und Sbp1p sind dagegen löslich und gehen nicht in den sekretorischen Weg ein. Für jede mRNA wurde analog den Mikroarray-Experimenten eine relative Membrananreicherung (Signalverhältnis Membran/ Zytosol) berechnet und den durch Mikroarray-Analysen erhaltenen Werten gegenübergestellt.



Die Northern-Blot-Signale der *GAS5*, *VPH1* und *SIM1* mRNAs sind im WT-Stamm in der membranangereicherten Fraktion deutlich stärker als in der zytosolischen Fraktion (Abb. 3.29, Spuren 1 und 2). Dagegen zeigt sowohl die *RPL25* mRNA als auch die *SBP1* mRNA im WT-Stamm ein stärkeres Signal in der zytosolischen Fraktion. Entsprechende Ergebnisse werden für den Scp160p-depletierten Stamm erhalten (Abb. 3.29, Spuren 3 und 4).

Eine Gegenüberstellung der durch Northern-Blot und durch Analyse der entsprechenden Mikroarrays erhaltenen Signalverhältnisse in der membranangereicherten und der zytosolischen Fraktion (Abb. 3.29) zeigt, dass beide Techniken für den WT-Stamm sehr ähnliche Werte ergeben. Während jedoch die Mikroarray-Experimente für die M→Z-mRNAs eine Verringerung des Signalverhältnisses M/Z im Scp160p-depletierten Stamm zeigen, ist dieses Verhältnis nach den Analysen der Northern-Blots in beiden Stämmen weitgehend gleich. Ebenso wird das Ausmaß der anhand der Mikroarray-Experimente für Z→M-mRNAs erhaltenen Signalverschiebungen durch Northern-Blot nicht bestätigt. Auch die Analyse eines dritten unabhängigen Experiments ergab nach Depletion von Scp160p für die untersuchten mRNAs keine Änderung der Membrananreicherung.

3.3.3.3 Analyse der Poly(A)-Länge ausgewählter mRNAs

Eine der möglichen Erklärungen für die unterschiedlichen Ergebnisse in den durchgeführten Mikroarray-Experimenten und Northern-Blots ist die in beiden Techniken unterschiedliche Art des Nachweises der mRNA (siehe auch Diskussion zu diesem Abschnitt): Während der Northern-Blot auf einer Hybridisierung einer Sonde mit der kodierenden Region der mRNA beruht, hängt die für die Mikroarray-Analysen nötige cDNA-Synthese von der Hybridisierung eines Oligo(dT)-Primers mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA ab. Durch die Verwendung des Oligo(dT)-Primers kann die

Effizienz der cDNA-Synthese während der Mikroarray-Analyse somit von der Länge des Poly(A)-Schwanzes spezifischer mRNAs abhängen, während sich derartige Unterschiede im Northern-Blot nicht nachweisen lassen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde durch RACE-PAT (Salles *et al.*, 1999) die Länge des Poly(A)-Schwanzes für potentiell von einer Scp160p-Depletion betroffene mRNAs bestimmt (Abb. 3.30). Als Modell-Substrate wurden die schon zuvor anhand von Northern-Blot untersuchten mRNAs ausgewählt. Aufgrund der angewandten Technik (RACE-PAT) wird als Ergebnis ein heterogenes Gemisch von PCR-Produkten erhalten unterschiedlicher Länge erhalten. Diese Heterogenität spiegelt die Länge des Poly(A)-Schwanzes wider. Die tatsächliche Länge des Poly(A)-Schwanzes der untersuchten mRNA ist 12 Nukleotide länger als die Längenheterogenität der erhaltenen PCR-Produkte.

Die Versuche ergeben im *WT*-Stamm (WT) für die Z→M mRNAs *RPL25* und *SBP1* in der membranangereicherten und der zytosolischen Fraktion PCR-Produkte mit einer Länge von 230-270bp bzw. 205-230bp. Dies deutet auf Poly(A)-Längen von 40-50 Nukleotiden (*RPL25* mRNA) bzw. 25-35 Nukleotiden (*SBP1* mRNA) hin. Depletion von Scp160p (depl) hat keinen Einfluss auf die Länge des Poly(A)-Schwanzes dieser mRNAs. Eine ähnliche Auswertung der untersuchten M→Z-mRNAs *GAS5*, *VPH1* und *SIM1* zeigt, dass diese mRNAs in den zytosolischen Fraktionen (Z) einen deutlich verlängerten Poly(A)-Schwanz (bis zu ~100 Nukleotiden) im Vergleich zu den membranangereicherten Fraktionen (M; ~25-35 Nukleotide) aufweisen. Die in beiden Fraktionen beobachteten Poly(A)-Längen bleiben bei allen untersuchten M→Z-mRNAs nach Depletion von Scp160p (depl) unverändert. Eine besondere Situation tritt bei der *GAS5* mRNA auf: Hier deuten die multiplen in den membranangereicherten Fraktionen zu beobachtenden diffusen Banden bei ~180, 196, 212 und 233 Nukleotiden Länge darauf hin, dass diese mRNA alternative Polyadenylierungsstellen aufweist. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die zuvor beschriebenen Beobachtungen.

Dieser Versuch zeigt, dass Scp160p keinen Einfluss auf die Länge des Poly(A)-Schwanzes der untersuchten mRNAs hat. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die zuvor beobachteten Unterschiede zwischen Mikroarray-Versuchen und den entsprechenden Kontrollen durch Northern-Blot nicht auf eine lokalisations- und Scp160p-abhängige Beeinflussung der Poly(A)-Länge spezifischer mRNAs zurückzuführen sind.

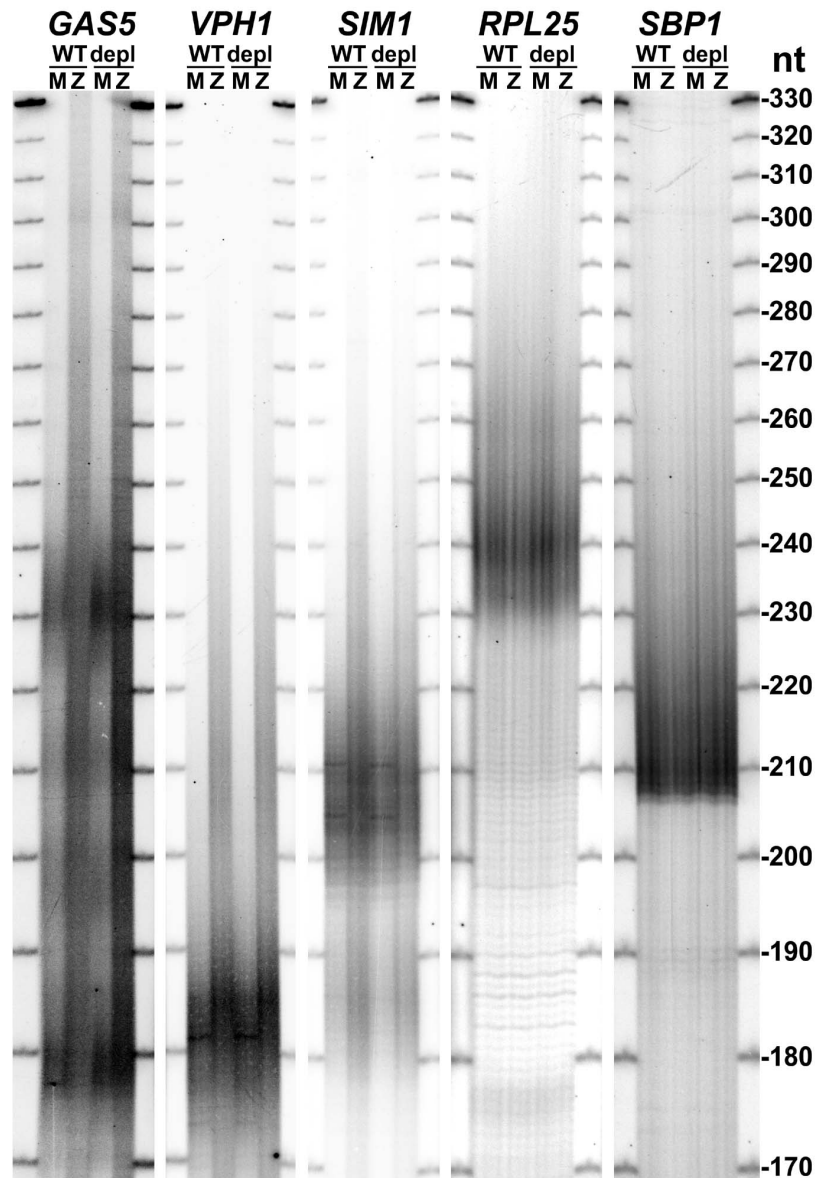


Abb. 3.30 Bestimmung der Poly(A)-Länge ausgewählter selektierter mRNAs durch RACE-PAT

Gleiche Mengen Gesamt-RNA aus membranangereicherten und zytosolischen Fraktionen eines *WT*-Stammes (FY23) und eines *Scp160p*-depletierten *P_{GAL/SCP}-SCP160*-Stammes (SFY72) wurde mit dem Oligo(dT)-Anker-Primer revers transkribiert. Erhaltene cDNA wurde durch PCR unter Verwendung des Oligo(dT)-Anker-Primer und eines für die angegebenen mRNAs spezifischen Primers unter Einsatz radioaktiv markierter Nukleotide amplifiziert. Die entstehenden PCR-Produkte wurden auf einem 5%-igen TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt, die Gele getrocknet und radioaktive Signale mit einem Phosphorimager ausgewertet.

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

M: membranangereicherte Fraktion (P10); Z: zytosolische Fraktion (S25); WT: *WT*-Stamm; depl: *Scp160p*-depletierter Stamm; nt: Nukleotide.

Zusammenfassend wurden anhand von Mikroarray-Experimenten Hinweise darauf erhalten, dass Scp160p einen Einfluss auf mRNAs in einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion ausübt. Dies betrifft zwei Gruppen von mRNAs, deren Mikroarray-Signale sich nach Depletion von Scp160p in entgegengesetzter Richtung zwischen einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion verschieben. Die von den mRNAs in beiden Gruppen kodierten Proteine zeichnen sich durch für jede Gruppe charakteristische Eigenschaften bezüglich Lokalisation, Funktion, Größe und Anzahl der Transmembran-Domänen aus. Die anhand von Mikroarrays gefundene Signalverschiebung konnte anhand von Northern-Blots nicht bestätigt werden. Anhand von Northern-Blots konnte kein Einfluss von Scp160p auf die physikalische Verteilung von mRNAs zwischen zytosolischer und membranangereicherter Fraktion nachgewiesen werden. Die Northern-Blots bestätigen jedoch die im *WT*-Stamm durch Mikroarray-Analyse erhaltenen Membrananreicherungen. Die Bestimmung der Poly(A)-Länge einzelner mRNAs zeigt, dass die Diskrepanz zwischen beiden Techniken nicht auf eine unterschiedliche Poly(A)-Länge in beiden zellulären Kompartimenten als Reaktion auf die Depletion von Scp160p zurückzuführen ist.

4 DISKUSSION

4.1 Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Scp160p

4.1.1 Scp160p ist am ER angereichert

Durch Fluoreszenzmikroskopie von GFP-markiertem Scp160p in lebenden Zellen sowie durch Zellfraktionierung konnte gezeigt werden, dass sich der Großteil des Multi-KH-Domänen-Proteins Scp160p an der ER-Membran befindet. Ein kleinerer Teil ist in einer membranfreien Fraktion mit zytosolischen Ribosomen enthalten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit einer früheren Veröffentlichung, in der durch indirekte Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte, dass Scp160p mit dem ER-Markerprotein Kar2p kolokalisiert (Wintersberger *et al.*, 1995). Die vorwiegende Lokalisation von Scp160p am ER deutet darauf hin, dass das Protein eine Rolle bei ER-spezifischen Vorgängen wie Synthese von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen spielt.

Eine ähnliche Lokalisation wie Scp160p zeigt Vigilin, das Scp160p-homologe Protein in Säuger-Zellen: In Pankreaszellen der Ratte assoziiert der Hauptteil von Vigilin mit Ribosomen am rauen ER, daneben liegt ein kleinerer Anteil im Komplex mit zytosomatischen Polysomen vor (Klinger & Kruse, 1996). Zusätzlich wurde beschrieben, dass sich ein weiterer Anteil von Vigilin im Zellkern befindet (Klinger & Kruse, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000).

4.1.2 Scp160p bindet mRNA-abhängig an zytosolische und membrangebundene Polysomen

Der zytosolische Anteil von Scp160p geht eine salzsensitive Interaktion mit schweren zytosolischen Polysomen ein. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer früheren Arbeit (Weber *et al.*, 1997), stimmt jedoch mit einer späteren Veröffentlichungen einer anderer Gruppe (Lang & Fridovich-Keil, 2000) überein. Die Interaktion von Scp160p mit zytosolischen Polysomen ist abhängig von mRNA: Nach Behandlung mit S1-Nuklease in einer Konzentration, die zum Verdau von mRNA, nicht aber von ribosomaler RNA führt, wird Scp160p von Ribosomen freigesetzt. Dies deutet darauf hin, dass die mRNA für die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen Scp160p und Ribosomen notwendig ist.

Aus einer membranangereicherten Fraktion solubilisiertes Scp160p kosedimentiert auf Saccharose-Dichtegradienten mit Mono- und Polysomen sowie der Translokationskomponente Sec61p. Ferner zeigt eine nach Nuklease- oder EDTA-Behandlung beobachtete Ablösung von Scp160p von einer membranangereicherten Fraktion, dass mRNA und Ribosomen für die Assoziation von Scp160p mit der ER-Membran nötig sind. Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass Scp160p *in vivo*

mit ER-gebundenen Polysomen interagiert. Durch Verdau der mRNA wird von einer membranangereicherten Fraktion ein geringerer Teil von Scp160p freigesetzt als von zytosolischen Ribosomen. Dies legt nahe, dass neben Ribosomen auch andere Faktoren an der Interaktion von Scp160p mit der Membran beteiligt sein könnten. Die Interaktion von Scp160p mit zytosolischen und ER-gebundenen Polysomen sowie die vorwiegende Lokalisation von Scp160p am ER sind Hinweise darauf, dass das Protein eine Rolle bei der Translation, insbesondere bei der Synthese von Membran- und/oder sekretierten Proteinen spielt.

Diese Deutung passt zu der Beobachtung, dass Vigilin in höheren Eukaryonten eine besonders hohe Expression in Geweben mit hoher Sekretion und Proteinsyntheserate aufweist (Kruse *et al.*, 1998a). In die gleiche Richtung weisen Daten, die zeigen, dass Vigilin in mikrosomalen Präparationen aus Hundepankreas mit membran-gebundenen Ribosomen interagiert (Neu-Yilik und Dobberstein, unveröffentlicht).

4.1.3 Scp160p bindet an eine Subfraktion von Ribosomen

Die bevorzugte Lokalisation von Scp160p am ER unterscheidet sich deutlich von der Lokalisation der Gesamtheit aller Ribosomen in der Zelle. Zudem wird die Bindung von Scp160p an Membranen unter Bedingungen gesättigt, bei denen die Konzentration von Scp160p in der Zelle noch immer deutlich unter der Konzentration der Ribosomen liegt (nicht gezeigt). Scp160p bindet folglich spezifisch an eine Subfraktion von mRNA-Ribosomen-Komplexen. Weitergehend ist die mRNA-Abhängigkeit der Assoziation von Scp160p mit zytosolischen und ER-gebundenen Ribosomen ein Hinweis darauf, dass diese Spezifität durch die selektive Bindung von Scp160p an definierte mRNAs bestimmt sein könnte. Dies deutet auf eine Rolle von Scp160p bei der Translation einer *definierten Gruppe* von Proteinen hin.

Diese Interpretation ist konsistent mit Beobachtungen, die zeigen, dass Deletion von Scp160p *keinen generellen* Einfluss auf die Synthese von Proteinen hat (M.Seedorf, unveröffentlichte Ergebnisse). Damit grenzt sich die Funktion von Scp160p klar von der Funktion anderer mRNA- und ribosomenassoziiierter Faktoren wie dem Poly(A)-bindenden Protein Pab1p oder eIF4G, einer Komponente des an die CAP-Struktur der mRNA bindenden Komplexes, ab. Im Gegensatz zu Scp160p sind die genannten Proteine an der *generellen* Regulation der Translation beteiligt (Jacobson, 1996; Sachs, 2000).

Die diskutierten Daten deuten darauf hin, dass Scp160p definierte mRNA-Substrate erkennt. Untersuchungen an anderen Proteinen aus der Vigilin-Familie zeigen, dass auch diese zu einer **selektiven Nukleinsäure-Bindung** fähig sind: *Xenopus*-Vigilin zeigt *in vitro* eine erhöhte Affinität für unstrukturierte RNA-Bereiche mit (A)_nCU und UC(A)_n-Motiven und einer Mindestlänge von 75 Nukleotiden (Kanamori *et al.*, 1998). Eine ähnliche Bindspezifität, jedoch für einzelsträngige DNA, zeigt DDP1, das

Scp160p-homologe Protein in *Drosophila melanogaster*. DDP1 bindet sequenz-spezifisch an den unstrukturierten C-Strang zentromerer Dodekasatellit-DNA. Eine effiziente Bindung erfordert eine minimale Länge von 75-100 Nukleotiden und wird durch die Abwesenheit stabiler Sekundärstrukturen erleichtert. Ein in natürlich auftretenden Dodekasatellit-Sequenzen hoch konservierter Guaninrest ist für die effiziente Bindung von DDP1 essenziell (Cortes & Azorin, 2000).

Im Unterschied zu den diskutierten Daten, die nahelegen, dass Scp160p direkt mit spezifischen mRNA-Substraten interagiert, beschreiben Studien anderer Autoren eine Interaktion von Vigilin aus Säugerzellen mit tRNA, dem tRNA-bindenden Translations-Elongationsfaktor EF1 α und dem tRNA-spezifischen Kernexportfaktor Exportin-t (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000). Die Autoren spekulieren daher über eine Beteiligung von Vigilin am tRNA-Export aus dem Zellkern. Im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Bittins, 2002; Vogt, 2001) konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass auch Scp160p mit EF1 α interagiert. Eine stabile Interaktion mit tRNA konnte in eigenen Versuchen jedoch nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

4.1.4 Die Anreicherung von Scp160p an der ER-Membran setzt ein funktionelles Tubulin-Zytoskelett voraus.

Die Assoziation von Scp160p mit ER-Membranen ist von einem intakten Tubulin-Zytoskelett abhängig. Für eine Dissoziation von Scp160p von der Membran ist eine aktive Translation der mRNA notwendig. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mikrotubuli für den *Transport* von Scp160p an die ER-Membran nötig sind und dass die *Verankerung* von Scp160p an der Membran von der Translation der gebundenen mRNA abhängt. Die hohe Scp160p-Konzentration am ER spiegelt somit den Endpunkt eines Transports von Scp160p wider: Zytosolisches Scp160p wird zur ER-Membran transportiert und verbleibt dort während der Translation einer gebundenen mRNA. Zusammen mit der Spezifität der Bindung von Scp160p an eine Subfraktion von mRNA-Ribosomen-Komplexen deutet dieses Modell darauf hin, dass Scp160p durch Bindung spezifischer ER-gebundener mRNAs einen Einfluss auf deren Translationsgeschwindigkeit oder Reinitiationsrate ausübt. Scp160p könnte so zur lokalen posttranskriptionalen Regulation spezifischer mRNAs – etwa in Bezug auf ihre Stabilität und/oder Translation – an der ER-Membran beitragen.

In differenzierten Zellen findet sich eine derartige **lokale posttranskriptionale Regulation** spezifischer mRNAs in Neuronen während des Lernprozesses: In den Somata und proximalen Dendriten spezieller Neuronen wird während des Lernprozesses die Gruppe der neuronenspezifischen RNA-bindenden, ELAV-ähnlichen Proteine HuB, HuC und HuD (Antic & Keene, 1997) lokal vermehrt exprimiert (Cavallaro *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2001). Die Proteine binden an definierte A-

und U-reiche Sequenzen im 3'-UTR spezifischer Ziel-mRNAs (Ma *et al.*, 1997) und erhöhen so deren Stabilität und/oder Translation (Antic & Keene, 1997; Antic *et al.*, 1999; Fan & Steitz, 1998; Ford *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998). Einer Hypothese zufolge vermitteln ELAV-ähnliche Proteine dadurch eine post-transkriptionale und lokale Kontrolle der Expression von Proteinen, die am Lernvorgang beteiligt sind (Quattrone *et al.*, 2001). Auch in *Drosophila* wurden Beispiele für lokale Translationskontrolle beschrieben: Die Kontrolle der Lokalisation und Translation von *oskar* und *nanos* mRNAs werden durch Sequenzen im jeweiligen 3'-UTR kontrolliert. Die für die Translationskontrolle zuständigen Sequenzen liegen innerhalb der Regionen im 3'-UTR, die für die Lokalisation essentiell sind (Gavis & Lehmann, 1994; Gavis *et al.*, 1996; Kim-Ha *et al.*, 1995; Kim-Ha *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse haben zu einem Modell geführt, demzufolge die Lokalisationsmaschinerie mit der für eine Translations-Repression zuständigen Maschinerie um die gleichen Bindungsstellen kompetiert (Bergsten & Gavis, 1999). Nach diesem Modell hebt die Assoziation des 3'-UTRs mit der Lokalisations-Maschinerie die translationale Repression auf und koppelt so die korrekte Lokalisation der mRNA mit ihrer Translation. Ein prominentes Beispiele für lokale Translationskontrolle am ER findet sich in *Xenopus*. Hier wird die *Vg1* mRNA zytoskelettabhängig zu einem Subkompartiment des ER am vegetativen Pol der Eizelle transportiert (Deshler *et al.*, 1997); erst nach erfolgter Verankerung wird eine durch Sequenzen im 3'-UTR vermittelte Translationshemmung aufgehoben (Wilhelm *et al.*, 2000).

Aufgrund der vorliegenden Daten kann keine *direkte* Aussage darüber gemacht werden, ob Scp160p erst nach seinem **Transport zur ER-Membran** mit mRNA assoziiert oder bereits im Komplex mit mRNAs vom Zytosol zur Membran transportiert wird. Die Beobachtung, dass in Hefe-Gesamtlysat nur eine sehr geringe Menge von Scp160p in einer polysomenfreien Fraktion (S200) vorliegt, legt jedoch einen Transport von Scp160p im Komplex mit Ribosomen und mRNA nahe. Alternativ könnte der kleine ribosomenfreie Scp160p-Anteil im Zytosol mikrotubuliabhängig zum ER transportiert werden. Eine RNA-Assoziation dieses polysomenfreien Scp160p-Anteils wurde zwar bislang nicht nachgewiesen, ist aber aufgrund der starken Bindung von Scp160p an RNA *in vitro* (Weber *et al.*, 1997) wahrscheinlich. Beide Möglichkeiten – eine aktive Lokalisation von Scp160p im Komplex mit mRNA und Ribosomen oder ein Transport eines ribosomenfreien Scp160p-mRNA Komplexes - deuten somit darauf hin, dass Scp160p mikrotubuliabhängig und gebunden an mRNA zur ER-Membran gelangt. Dies steht im Widerspruch zu einem Modell, demzufolge Transport und Verankerung lokalisierter mRNAs in kleinen Zellen wie Hefe vorwiegend vom Aktin-Zytoskelett abhängen (Long *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1997). Ein mikrotubuliabhängiger mRNA-Transport über große Entfernungen

findet sich dagegen häufig in Zellen wie Neuronen, Oligodendrozyten und Oozyten. So vermittelt etwa Staußen mikrotubuliabhängig die Lokalisation und translationale Kontrolle von *oskar* mRNA am posterioren Ende der *Drosophila*-Oozyte (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991) ebenso wie die Verankerung von *bicoid* mRNA am vorderen Ende der Oozyte (St. Johnston *et al.*, 1989). In den genannten Beispielen sind Mikrotubuli für die Interaktion von mRNAs mit dem Zytoskelett während des Transports ebenso nötig wie für die Verankerung der mRNAs an ihrem Ziel. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten legen nahe, dass in einem ähnlichen Prozess auch in Hefe spezifische zytosolische Scp160p-mRNA-Komplexe mikrotubuliabhängig zur ER-Membran transportiert werden. Die Verankerung am ER ist jedoch im Gegensatz zur Verankerung der *oskar* und *bicoid* mRNAs unabhängig vom Zytoskelett.

Der Transport von Scp160p zum ER hängt von Mikrotubuli ab. Ein derartiger **aktiver Transport zum ER** wurde bislang nur in wenigen Beispielen beschrieben: Das in den meisten Geweben exprimierte Protein Staußen spielt eine Rolle beim Transport großer RNPs zum ER. Staußen interagiert mit Mikrotubuli und Polysomen und kolokalisiert mit Marker-Proteinen für das rauhe ER (Kiebler *et al.*, 1999; Marion *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999). Dennoch bleibt bislang unklar, ob die beobachteten Staußen-enthaltenden Komplexe vesikulierte ER/Staußen-Komplexe repräsentieren oder ob die Komplexe selbst eine Rolle beim mRNA-Transport spielen. Ein weiteres Beispiel für mRNA-Transport zum ER existiert in *Xenopus* Oozyten, wo das Zipcode-bindende Protein (ZBP1) den mikrotubuliabhängigen Transport der *Vg1* mRNA zu einer Subdomäne des ER erleichtert (Deshler *et al.*, 1997). Ähnlich werden in Reissamen spezifische für Speicherproteine kodierende mRNAs zu einer Subdomäne des ER dirigiert (Choi *et al.*, 2000).

Die Freisetzung von Scp160p von der ER-Membran ist abhängig von Translation. Dies legt nahe, dass Scp160p-gebundene mRNAs durch ihre Translation an der Membran verankert werden und erst nach Termination der Proteinsynthese vom ER entlassen werden. Eine derartige **translationsabhängige Lokalisation von mRNA** ist allen mRNAs gemein, die für kotranslational ins ER translozierte Proteine kodieren. In diesen Fällen wird die mRNA während der Proteinsynthese durch die wachsende Polypeptidkette an der Membran verankert (Görllich *et al.*, 1992a; Görllich *et al.*, 1992b). Ein Beispiel für eine translationsabhängige Verankerung einer mRNA, die für ein Protein kodiert, das nicht in den sekretorischen Weg eingeht, ist die *ASH1* mRNA in Hefe: *ASH1* mRNA kodiert einen Transkriptionsfaktor, der am Wechsel des Paarungstyps beteiligt ist (Bobola *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1997). Die Lokalisation von *ASH1* mRNA an der Spitze der Tochterzelle hängt neben der Funktionalität von fünf *SHE*-Genen (Jansen *et al.*, 1996) auch von der Translation der *ASH1* mRNA ab (Gonzalez *et al.*, 1999). Die spezifische Lokalisation von *ASH1* mRNA ist in einem

scp160Δ-Stamm gestört (RP.Jansen und M.Seedorf unveröffentlicht; Irie *et al.*, 2002). Diese Daten weisen darauf hin, dass Scp160p eine Rolle bei der Lokalisation oder translationsabhängigen Verankerung der *ASH1* mRNA spielt. Analog könnte Scp160p an der Translation weiterer – insbesondere lokalisierter - mRNAs beteiligt sein.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente, dass Scp160p mit einer Subfraktion von schweren membrangebundenen und zytosolischen Polysomen eine sättigbare Interaktion eingeht. Diese Interaktion hängt von mRNA ab und ist spezifisch für eine Subfraktion von mRNA-Polysomen-Komplexen. Der Transport von Scp160p zur ER-Membran ist tubulinabhängig. Es ist daher möglich, dass Scp160p spezifische mRNAs selektiv erkennt und eine Rolle im Zusammenhang mit ihrer Lokalisation, Verankerung und lokalen Translationskontrolle spielt.

4.2 Analyse der Funktion einzelner Domänen und Sequenzen in Scp160p

4.2.1 Die AS 98-142 von Scp160p enthalten ein Kernimport-Signal

Die Aminosäuren 98-142 von Scp160p enthalten ein Kernimport-Signal, das einen aktiven und Ran-abhängigen Transport eines 2xGFP-Reporterproteins sowie C-terminal verkürzter Scp160p-Konstrukte in den Zellkern vermittelt. Inaktivierende Mutationen innerhalb des Kernimport-Signals haben unter optimalen Wachstumsbedingungen keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Gesamtproteins, die nach Funktionsverlust von Scp160p beobachtete Zunahme der chromosomalen DNA (Wintersberger *et al.*, 1995) zu unterdrücken. Das Kernimport-Signal führt unter normalen Wachstumsbedingungen nicht zu einer Kernlokalisierung des Gesamtproteins. Auch in Mutanten mit Defekten im Kernexport und nach Überexpression wurde keine Kernlokalisierung von Scp160p beobachtet. Scp160p pendelt daher nicht in großen Mengen im Komplex mit RNAs zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Da unter den betrachteten Überexpressions-Bedingungen der Großteil von Scp160p nicht mit dem ER kolokalisiert und nur ein Teil mit Polysomen interagiert, sind diese Daten ein Hinweis darauf, dass der C-Terminus von Scp160p eine zytoplasmatische Retention des Gesamtproteins bewirkt, die nicht durch eine Polysomenassoziation vermittelt wird. Ein möglicher Mechanismus für eine derartige Retention stellt z.B. die oben beschriebene Assoziation von Scp160p mit dem Zytoskelett dar. Eine alternative Erklärung ist eine Proteinkonformation, die zu einer Abschirmung des N-terminalen Kernimport-Signals durch den C-Terminus führt.

Auf **mögliche nukleäre Funktionen** von Scp160p deuten Beobachtung hin, die zeigen, dass Deletion von *SCP160* zu einem erhöhten DNA-Gehalt führt (Wintersberger *et al.*, 1995). Scp160p könnte somit eine direkte Rolle bei der Verteilung von Chromosomen zwischen Mutter- und Tochterzelle spielen. Einen weiteren Hinweis auf eine Kernlokalisierung von Scp160p liefert DDP1 das Scp160p-homologe Protein in *Drosophila melanogaster*. Dieses befindet sich entwicklungsabhängig im Zellkern, bindet an spezifische DNA-Sequenzen und komplementiert die DNA-Zunahme eines *scp160Δ*-Stammes (Cortes *et al.*, 1999). Daneben wurde auch in Säuger-Vigilin ein funktionelles Kernimport-Signal charakterisiert und neben der zytoplasmatischen auch eine nukleäre Lokalisation beschrieben (Kruse *et al.*, 1998b; Kugler *et al.*, 1996).

Das Kernimport-Signal in AS 98-142 ist von der Anwesenheit basischer Reste abhängig. Diese Eigenschaft teilt es sowohl mit "klassischen" Kernimport-Signalen mit einer ununterbrochenen Abfolge von 6-7 basischen Aminosäuren vom Typ des SV40-NLS als auch mit zweigeteilten Kernimport-Signalen, die durch zwei kurze, basische, durch wenige AS getrennte Sequenzen charakterisiert sind (Dingwall & Laskey, 1991; 1998). Die *mehrfach* unterbrochene Anordnung der zur Funktion des Kernimport-Signals benötigten basischen AS sowie die größere Länge der zur vollen Aktivität benötigten Sequenz grenzen das Kernimport-Signal in Scp160p jedoch klar von diesen prototypischen Kernimport-Signalen ab.

In den durchgeführten Versuchen wurden keine Bedingungen gefunden, unter denen Scp160p in den Zellkern gelangt. Die Identifizierung eines kryptischen Kernimport-signals legt jedoch ebenso wie die Vergleiche zu den Scp160p-homologen Proteine in Vertebraten nahe, dass Scp160p unter spezifischen Bedingungen eine nukleäre Funktion einnehmen könnte.

4.2.2 Verlust von Scp160p führt zu einer koordinierten DNA-Verdopplung

Deletion von *SCP160* führt nach wenigen Zellteilungen zu einer irreversiblen Zunahme des DNA-Gehalts, einer abnormen Zellmorphologie sowie einer verringerten Lebensfähigkeit der Zellen (Wintersberger *et al.*, 1995). Daneben kommt es bei Kreuzungen von *scp160Δ*-Mutanten untereinander oder mit *WT*-Stämmen zu einer unregelmäßigen Verteilung genetischer Marker.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die DNA-Zunahme in einem *scp160Δ*-Stamm bestätigt werden. Zusätzlich zeigen die durchgeführten FACS-Analysen, dass Deletion von *SCP160* zu einer *genauen Verdopplung* der DNA ohne gehäuftes Auftreten von Zwischenstufen mit heterogenem DNA-Gehalt führt. Dies legt nahe, dass die beschriebene Zunahme des DNA-Gehaltes durch koordinierte Verdopplung aller

Chromosomen hervorgerufen wird. Deutlicher wird dies anhand der Analyse des DNA-Gehalts eines Stammes, in dem die Expression von Scp160p zu einem definierten Zeitpunkt ausgeschaltet wurde. Depletion von Scp160p führt in einem solchen Stamm nach 20-25 Stunden zur langsamen Anhäufung von Zellen mit verdoppeltem DNA-Gehalt. Die Abwesenheit eines im Vergleich zum *WT*-Stamm erhöhten Anteils von Zwischenstufen, die in der G2-Phase einen heterogenen DNA-Gehalt *zwischen* $2n$ und $4n$ aufweisen, deutet darauf hin, dass diese Zunahme des DNA-Gehalts nicht die Konsequenz einer allmählichen Anhäufung zusätzlicher Chromosomen ist. Vielmehr spricht die genaue Verdopplung des DNA-Gehalts ohne erkennbare Zwischenstufen dafür, dass Scp160p-Depletion zu einer koordinierten Verdopplung aller Chromosomen führt, die möglicherweise durch eine Mitose ohne Kern- und Zellteilung bewirkt wird. Derartige koordinierte Chromosomenverdopplungen wurden in Hefe auch nach Deletion von *SCW3* oder *SIM1* beschrieben, die für Mitglieder einer Familie von Zellwandproteinen kodieren (Dahmann *et al.*, 1995; Mouassite *et al.*, 2000). Im Detail wird auf diese Beispiele an späterer Stelle eingegangen.

4.2.3 Die Unterdrückung der DNA-Verdopplung ist unabhängig von einer Polysomenassoziation von Scp160p

Versuche zur Eingrenzung von Scp160p-Domänen, die zur Komplementation der DNA-Verdopplung nötig sind, zeigten, dass Deletion zweier C-terminaler KH-Domänen von Scp160p keinen Einfluss auf den zellulären DNA-Gehalt hat, Deletion von 4 oder mehr C-terminalen KH-Domänen von Scp160p dagegen zu einer Verdopplung der DNA führt. Die KH-Domänen 11 und 12 beinhalten daher Sequenzen, die für die Unterdrückung der Chromosomenverdopplung notwendig sind. Ein Stamm, der nur die Aminosäuren 1-320 von Scp160p exprimiert, zeigt einen tetraploiden Phänotyp. Die Ursache dieser weiteren Verstärkung des *scp160Δ*-Phänotyps ist nicht bekannt. Es kann jedoch spekuliert werden, dass die verbleibenden drei N-terminalen KH-Domänen durch Interaktion mit regulatorischen Faktoren einen dominant negativen Phänotyp verursachen, der weitere Kontrollfunktionen innerhalb des Zellzyklus inaktiviert. Interessanterweise befindet sich der N-terminale Bereich (AS 1-320) von Scp160p nach Überexpression im Zellkern. Zusammen mit den bereits diskutierten Indizien für eine mögliche nukleäre Funktion von Scp160p legen diese Beobachtungen nahe, dass die N-terminalen 320 AS von Scp160p durch ihre Präsenz im Zellkern den beobachteten Phänotyp hervorrufen.

Deletion zweier C-terminaler KH-Domänen von Scp160p führt zum vollständigen Verlust der Polysomenassoziation, im gleichen Stamm ist jedoch keine Zunahme des DNA-Gehaltes zu beobachten. Eine Polysomenassoziation von Scp160p ist daher zur Komplementation der DNA-Verdopplung nicht nötig. Dies deutet darauf hin, dass

die Komplementation der DNA-Verdopplung in *WT*-Zellen auf den kleinen polysomenfreien Scp160p-Anteil zurückzuführen sein könnte und nicht aus dem Verlust einer Scp160p-abhängigen Translationskontrolle spezifischer mRNAs resultiert, für die eine Polysomenassoziation von Scp160p nötig ist.

Zusammenfassend legen die diskutierten Daten zur Lokalisation von Scp160p und der Funktion einzelner Scp160p-Abschnitte nahe, dass Scp160p in unterschiedlichen Kompartimenten verschiedene Funktionen ausüben könnte. Die vorwiegende Lokalisation von Scp160p an ER-gebundenen Polysomen deutet auf eine Rolle bei der Lokalisation, Verankerung oder Translation spezifischer mRNAs hin. Eine zweite Funktion, die zur Komplementation einer DNA-Verdopplung nach Verlust von Scp160p nötig ist, ist dagegen von einer Polysomenassoziation unabhängig. Die Identifizierung eines kryptischen Kernimport-Signals in Scp160p schlägt vor, dass Scp160p daneben eine weitere Rolle bei nukleären Vorgängen spielen könnte.

4.3 Einfluss einer Scp160p-Depletion auf den zellulären mRNA-Metabolismus

Viele der bisherigen Befunde legen eine Funktion von Scp160p im mRNA-Metabolismus nahe. Anhand von Mikroarray-Analysen wurde daher der Einfluss von Scp160p auf das Transkriptom - die Häufigkeit aller mRNAs - sowie auf ihre Verteilung zwischen einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion untersucht.

4.3.1 Einfluss von Scp160p auf das Transkriptom

Der Vergleich des Hefe-Transkriptoms in einem *WT*- und einem Scp160p-depletierten Stamm zeigte, dass nach Depletion von Scp160p nur etwas mehr als 1% aller mRNA-Spezies die Schwellenwert- und Stringenz-Kriterien (>1,5-fache Änderung und geringe Abweichung in zwei Experimenten) für mRNAs mit geänderter Häufigkeit erfüllen. Scp160p-Depletion beeinflusst dabei bevorzugt die Häufigkeit von mRNAs, die für Proteine kodieren, die in den sekretorischen Weg eingehen. Die meisten selektierten mRNAs weisen nach Scp160p-Depletion eine verringerte Häufigkeit auf. Die geringe Anzahl selektierter mRNAs zeigt, dass Scp160p keinen generellen Einfluss den mRNA-Metabolismus hat: nach Scp160p-Depletion treten nur selektive und vergleichsweise schwache Effekte auf eine kleine Auswahl spezifischer mRNAs auf. In allen Experimenten wies Scp160p mit einer durchschnittlich etwa achtfach verringerten mRNA-Häufigkeit im gesamten Transkriptom die größte reproduzierbare Änderung auf. Dies unterscheidet die Auswirkungen eines Verlustes von Scp160p von denen, die nach Deletion von Faktoren mit allgemeinerer Funktion wie z.B. Gcn4p beobachtet werden: Bei Aminosäure-Mangel wird Gcn4p, ein transkriptionel-

ler Aktivator von Genen, die an der Synthese von Aminosäuren beteiligt sind, induziert. Im Gegensatz zur geringen Anzahl der von Scp160p-Depletion betroffenen Gene bewirkt Deletion von *GCN4* in ähnlichen Mikroarray-Experimenten eine selektive und signifikante Expressionsänderung von mindestens 8% aller Hefe-Gene (Natarajan *et al.*, 2001).

Die Mehrzahl der durch Scp160p-Depletion betroffenen mRNAs zeigt im Scp160p-depletierten Stamm eine gegenüber dem *WT*-Stamm verringerte Häufigkeit. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Scp160p in diesen Fällen eine mRNA-stabilisierende Wirkung haben könnte. Ein ähnliche Stabilisierung spezifischer mRNAs wurde für Vigilin im *Xenopus*-System beschrieben (Cunningham *et al.*, 2000). Die Häufigkeit einer mRNA hängt jedoch neben ihrer Stabilität auch von ihrer Transkriptionsrate sowie von posttranskriptionalen Regulationsschritten ab (McCarthy, 1998). Die Vielfältigkeit der in diesen Stadien beteiligten regulatorischen Faktoren lässt anhand von Mikroarray-Versuchen daher keine direkten mechanistischen Aussagen zu.

Die bevorzugte Selektion von mRNAs, die für Proteine kodieren, die in den sekretorischen Weg eingehen, ist konsistent mit zuvor diskutierten Daten, wonach Scp160p bevorzugt mit ER-gebundenen Polysomen assoziiert. Zusammengekommen sind diese Daten ein Hinweis darauf, dass Scp160p eine Rolle im sekretorischen Weg spielen könnte.

4.3.2 Einfluss von Scp160p auf mRNAs in einer membrangebundenen und einer zytosolischen Fraktion

Die bevorzugte Lokalisation von Scp160p am ER sowie sein zytoskelettabhängiger Transport zum ER deuten auf eine Funktion von Scp160p beim Transport, der Verankerung oder der lokalen Translationskontrolle spezifischer mRNAs hin. Anhand von Mikroarrays und Northern-Blots wurde untersucht, ob Depletion von Scp160p einen Einfluss auf die Verteilung von mRNAs zwischen einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion hat.

Im *WT*-Stamm zeigen die Mikroarrays eine vorwiegende Anreicherung solcher mRNAs in der membranangereicherten Fraktion, die für Proteine kodieren, die in den sekretorischen Weg eingehen. Diese Daten decken sich gut mit veröffentlichten Ergebnissen eines analogen Experiments (Diehn *et al.*, 2000): mRNAs, die für integrale Membranproteine oder Proteine mit einer potentiellen Membranassoziation kodieren, zeigen häufig in der membranangereicherten Fraktion stärkere Signale als im Zytosol. Die im *WT*-Stamm durch Mikroarray-Analyse erhaltene Verteilung exemplarisch ausgesuchter mRNAs zwischen beiden Fraktionen konnte durch Northern-Blot bestätigt werden.

Gruppierung selektierter mRNAs

Anhand definierter Kriterien (siehe Methoden) wurden mRNAs selektiert, bei denen Scp160p-Depletion zu einer Verschiebung der Fluoreszenz-Signale zwischen einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion führt. Die anhand der Mikroarray-Analysen selektierten mRNAs lassen sich in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Charakteristika bezüglich der Lokalisation, Funktion und Eigenschaften der kodierten Proteine gliedern. Die eine Gruppe von mRNAs zeigt nach Depletion von Scp160p eine verringerte Membrananreicherung und kodiert für große Proteine mit vielen Transmembran-Domänen. Diese Proteine sind bevorzugt in der Zellwand, der Plasmamembran, dem ER oder der Vakuole lokalisiert und spielen häufig eine Rolle bei Glykosylierungsvorgängen, der Synthese von GPI-Membranankern, bei der Zellwandbiogenese oder bei Transportprozessen. In diese Gruppe fallen auch mRNAs, die für Untereinheiten großer Multiproteinkomplexe kodieren. Neben den zuvor genannten Argumenten ist der große Anteil von mRNAs in dieser Gruppe, die für Proteine kodieren, die in den sekretorischen Weg eingehen, ein weiterer Hinweis darauf, dass Scp160p einen lokalen Einfluss auf definierte mRNAs, etwa bei Lokalisation, Verankerung oder translationaler Kontrolle, haben könnte. Die zweite Gruppe selektierter mRNAs zeichnet sich durch die nach Scp160p-Depletion induzierte Verschiebung ihrer Fluoreszenzsignale zur membranangereicherten Fraktion aus und kodiert bevorzugt Proteine mit zytosolischer, mitochondrialer oder nukleärer Lokalisation. Diese Proteine sind häufig an Prozessen beteiligt, die einem Funktionsverlust von Proteinen der zuvor besprochenen Gruppe entgegenwirken könnten: Kontrolle der Zellwandintegrität, Erleichterung von Sekretionsvorgängen, Aufrechterhaltung von pH-Wert und Energiereserven, effiziente Gestaltung des zytosolischen und mitochondrialen Proteinstoffwechsels und Erleichterung der Bildung von Multiproteinkomplexen. Diese Daten sind konsistent mit einem Modell, in dem die erste Gruppe von mRNAs vermehrt direkte Substrate von Scp160p darstellen, die durch Verlust von Scp160p in ihrer Qualität geändert und so translational gehemmt werden, während die zweite Gruppe von mRNAs bevorzugt eine Reaktion der Zelle auf die so geänderten Rahmenbedingungen vermitteln.

Vergleich der Mikroarray-Ergebnisse mit Northern-Blots gegen ausgewählte mRNAs

Anhand von Northern-Blots wurde die Verteilung von fünf mRNAs, die in den Mikroarray-Versuchen reproduzierbar eine Signal-Verschiebung zwischen membranangereicherter und zytosolischer Fraktion ergaben, ebenso wie im *WT*-Stamm auch im Scp160p-depletierten Stamm untersucht. Diese Northern-Analysen zeigten im Gegensatz zu den entsprechenden Mikroarray-Versuchen für alle untersuchten mRNAs im Scp160p-depletierten Stamm die gleiche Membrananreicherung wie im

WT-Stamm. Die Relevanz und mögliche Bedeutung der Abweichung zwischen den Ergebnissen beider Methoden wird im folgenden diskutiert.

Beide Methoden, Mikroarray-Analyse und Northern-Blot, zeigen für sich betrachtet keine typischen Anzeichen für methodisch bedingte Fehlerquellen. Für Mikroarrays analytische Parameter wie Effizienz der cDNA-Synthese, Signalstärke, Klarheit der Datenpunkte, Verteilung der Fluoreszenzintensitäten sowie die Größe des abgedeckten Intensitätsbereichs lassen keine Zweifel an der methodischen Qualität der Experimente zu. Die in den Mikroarray-Experimenten beobachteten Signalverschiebungen sind innerhalb des selektierten Datensatzes in zwei unabhängigen Experimenten reproduzierbar. Eine bei selektivem Abbau einer RNA-Präparation zu erwartende gleichgerichtete Verschiebungstendenz der Signale aller mRNAs ist nicht zu beobachten. Vielmehr ist durch Depletion von Scp160p nur ein spezifischer Satz von mRNAs betroffen, der sich zudem in zwei definierte Gruppen mit unterschiedlicher Richtung der Verschiebung einteilen lässt. Ein weiteres Indiz für die Relevanz der Mikroarray-Daten liefern die mit den eigenen *WT*-Daten vergleichbaren veröffentlichten Ergebnisse (Diehn *et al.*, 2000). Für individuelle mRNAs beobachtete Abweichungen zwischen den veröffentlichten und eigenen Daten sind neben geringfügiger methodischer Unterschiede möglicherweise auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen: Den veröffentlichten Daten liegt meist nur ein Datenpunkt zugrunde, die eigenen Daten sind dagegen durch jeweils mindestens vier Datenpunkte abgesichert.

Ähnlich signifikant wie die durch Mikroarray-Analyse erhaltenen Daten erscheinen die Ergebnisse der durchgeführten Northern-Blots: Alle untersuchten mRNAs sind weitgehend intakt und zeigen qualitativ gute, klare Signale. Die im *WT*- und Scp160p-depletierten Stamm beobachteten Membrananreicherungen der analysierten mRNAs sind zudem innerhalb dreier unabhängiger Experimente gut reproduzierbar. Es scheint daher möglich, dass beide Ansätze zu sachlich richtigen Ergebnissen führen, die beobachteten Unterschiede also in den Charakteristika der angewandten Methoden begründet sind.

Insbesondere die mRNA-Analyse auf Mikroarrays weist kritische Parameter auf, die zu einer selektiven Beeinflussung einzelner mRNA-Signale führen könnten. So ist die Effizienz der Oligo(dT)-initiierten cDNA-Synthese potentiell abhängig von der Länge und Integrität des Poly(A)-Schwanzes. Möglicherweise wird die cDNA-Synthese außerdem durch Scp160p-abhängige und spezifisch in einer Fraktion vorhandene Faktoren selektiv beeinflusst. Die angewandte Mikroarray-Technik erfordert im cDNA-Syntheseschritt den Einsatz modifizierter Nukleotide, die in einer nachfolgenden chemischen Reaktion kovalent an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt werden. Auch dieser Schritt könnte - etwa durch Störung des Einbaus modifizierter

Nukleotide durch eine lokalisations- und Scp160p-abhängige Modifikation der RNA-Basen - fraktionsspezifische Unterschiede erklären. Der Nachweis von mRNAs durch Northern-Blot erfolgte dagegen unabhängig von der Qualität des Poly(A)-Schwanzes oder der Effizienz enzymatischer oder chemischer Reaktionen durch direkte Hybridisierung einer radioaktiven Sonde mit nahezu der gesamten kodierenden Region der mRNA. Mögliche Erklärungen der experimentell beobachteten Abweichungen zwischen beiden Techniken sind demzufolge (i) eine Veränderung der Länge des Poly(A)-Schwanzes definierter mRNAs in einer spezifischen Fraktion als Antwort auf die Depletion von Scp160p, (ii) eine für eine Fraktion charakteristische Veränderung der Effizienz der reversen Transkription spezifischer mRNAs oder (iii) eine Scp160p- und lokalisationsabhängige Veränderung der Qualität einer Subfraktion von mRNAs.

Bewertung von Mikroarray- und Northern-Blot-Experimenten

Aufgrund der zunächst widersprüchlichen Daten hängt die Interpretation der durchgeführten Versuche stark von der Bewertung der Verlässlichkeit der unterschiedlichen Methoden ab. Sollten die Northern-Blots die zelluläre Situation korrekt wiedergeben, die Mikroarray-Experimente dagegen mit experimentellen Fehlern belastet sein, so wäre aufgrund der durchgeführten Versuche – zumindest auf die im Northern-Blot untersuchten mRNAs – kein Scp160p- und lokalisationsabhängiger Effekt nachweisbar. Als zweite Möglichkeit kommt in Betracht, dass die Mikroarrays die zellulären Vorgänge richtig wiedergeben, die Northern-Blots dagegen Artefakte darstellen. Dies erscheint jedoch insbesondere aufgrund der in drei unabhängigen Experimenten guten Reproduzierbarkeit aller Northern-Blot-Ergebnisse unwahrscheinlich. Auch die theoretische Möglichkeit, dass *alle fünf* durch Northern-Blot überprüften mRNAs aufgrund zufälliger experimenteller Schwankungen der Mikroarray-Experimente selektiert wurden, ist aufgrund der angelegten Selektionskriterien sehr unwahrscheinlich.

Wie zuvor diskutiert wurde, legen die vorhandenen Indizien ein alternatives Szenario nahe: Trotz der scheinbar voneinander abweichenden Ergebnisse könnten beide Techniken eine reale Situation widerspiegeln. Die beobachteten Abweichungen wären somit durch die unterschiedlichen, zum Nachweis herangezogenen Eigenschaften der mRNA zu begründen. Durch ihre enzymatischen und chemischen Schritte ist insbesondere die Mikroarray-Technik potentiell empfindlich gegenüber Änderungen der mRNA-Qualität, die unter anderem Poly(A)-Länge, kovalente Modifikation oder eine nichtkovalente Assoziation mit Fremdmolekülen einschließen. Im diskutierten Szenario wäre Scp160p in der Lage, einen lokalen Einfluss auf die Qualität einer spezifischen Subfraktion von mRNAs auszuüben. Die durchgeführten Experimente legen nahe, dass eine Veränderung der Länge des Poly(A)-Schwanzes als möglicher Scp160p-abhängiger Qualitäts-Parameter nicht für die Abweichungen

zwischen Northern-Blots und Mikroarray-Analysen in Frage kommt. Ein Einfluss der weiteren angesprochenen Möglichkeiten - kovalente Modifikation oder eine Assoziation mit Fremdmolekülen - ist jedoch denkbar.

Insbesondere im Zusammenhang mit Ergebnissen, die auf eine Rolle von Scp160p bei der Translation spezifischer mRNAs hinweisen, stellt eine nichtkovalente Assoziation mit Fremdmolekülen - z.B. mikro-RNAs - eine interessante Hypothese dar: Mikro-RNAs werden in einer wachsenden Anzahl von Organismen gefunden (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001; Reinhart *et al.*, 2002). Die Prototypen dieser 21-22 Nukleotide langen RNA-Spezies sind *let-7* und *lin-4* aus *C.elegans* (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000). Durch unvollständige Basenpaarung mit Sequenzen im 3'-UTR spezifischer Substrat-mRNAs vermittelt *lin-4* eine translationale Repression der gebundenen mRNA und damit eine Regulation des zeitlichen Ablaufs der Entwicklung (Ambros, 2001). Die Substrat-mRNAs verbleiben trotz der translationalen Repression an Polysomen. Die Translationsinhibition durch mikro-RNAs erfolgt daher zumindest in den wenigen untersuchten Fällen nach der Initiation der Translation (Olsen & Ambros, 1999, Seggerson, 2002 #2578). An einem ähnlichen Prozess könnte Scp160p beteiligt sein, indem es z.B. an der ER-Membran für eine lokale Dissoziation eines im Zytosol während des Transports zum Zielort vorliegenden mikro-RNA/mRNA-Komplexes sorgt und so eine lokale Aufhebung der Translationsinhibition der mRNA unterstützt. Führt nun die Assoziation einer mikro-RNA mit ihrer Substrat-mRNA durch Interferenz mit der Reversen Transkriptase zu einer Hemmung der cDNA-Synthese während der Mikroarray-Analyse, so könnte dies eine mögliche Erklärung für die beobachtete Diskrepanz zwischen Mikroarray-Versuchen und Northern-Blots im Scp160p-depletierten Stamm darstellen.

Mögliche Funktion von Scp160p

Aufgrund der möglichen Interpretationen sind die vorliegenden Daten nicht geeignet, die Ursache für die beobachteten Abweichungen zwischen Mikroarray-Versuchen und Northern-Blots abschließend zu beurteilen oder eine Einschätzung über die funktionelle Relevanz der anhand der Mikroarrays selektierten mRNAs zu liefern. Die Analyse der zur Verfügung stehenden Daten gibt jedoch starke Hinweise darauf, dass Scp160p eine modulierende Rolle bei der lokalen Translationsregulation einer Gruppe von mRNAs spielt. Interessant ist eine derartige Effizienzregulation insbesondere für Untereinheiten von Multi-Protein-Komplexen. Vph1p ist eine Untereinheit der vakuolären Protonen-ATPase in Hefe (Manolson *et al.*, 1992a; Manolson *et al.*, 1992b), deren mRNA in den Mikroarray-Experimenten selektiert wurde. Die Synthese der einzelnen Untereinheiten des Gesamtkomplexes muss auf die Verfügbarkeit der anderen Komponenten sowie auf die Bedürfnisse der Zelle abgestimmt

werden (Graham *et al.*, 1998; Hill & Cooper, 2000; Leng *et al.*, 1998). Scp160p könnte in diesem Prozess eine Rolle spielen, indem es die Translationsgeschwindigkeit oder den Ort der Translation unterschiedlicher mRNAs koordiniert. Eine solche koordinierende Funktion könnte zur Ausbildung definierter Domänen innerhalb des ER beitragen, in denen eine charakteristische Auswahl von Proteinen synthetisiert wird. Ein Beispiel für eine solche Spezialisierung einzelner ER-Domänen stellen die bereits erwähnten Prolamin-Körperchen in Reissamen dar, an bzw. in denen die Synthese und Speicherung einer definierten Auswahl von Proteinen erfolgt (Choi *et al.*, 2000; Muench *et al.*, 2000; Muench *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). Die bevorzugte Selektion von mRNAs, die für Zellwand-Proteine, GPI-verankerte Proteine, Plasmamembran-Proteine und Untereinheiten von membranständigen Multiproteinkomplexen kodieren, könnte darauf hindeuten, dass in Hefe für die Synthese derartiger Proteine spezialisierte ER-Domänen existieren.

Neben Hinweisen auf eine Funktion von Scp160p bei der Synthese spezifischer Gruppen von Proteinen zeigen die Mikroarray-Daten auch eine mögliche mechanistische Verbindung zwischen einem Verlust von Scp160p und der beobachteten DNA-Verdopplung auf. Unter den mRNAs, deren Signal sich nach Scp160p-Depletion von der membranangereicherten in die zytosolische Fraktion verschiebt, finden sich die *SIM1* und *SCW3* mRNAs. Depletion von Scp160p führt außerdem zu einer Reduktion der Häufigkeiten beider mRNAs. *SCW3* und *SIM1* kodieren für Mitglieder einer Familie von Zellwandproteinen in *Saccharomyces cerevisiae*, die sich durch Homologien im C-Terminus der kodierten Proteine und durch Sequenzähnlichkeiten zu einer β -Glukosidase in *Candida wickerhamii* auszeichnet (Velours *et al.*, 2002). Deletion von *SCW3* oder *SIM1* führt unabhängig voneinander ähnlich wie Deletion von *SCP160* zu Zellen mit verdoppeltem DNA-Gehalt (Dahmann *et al.*, 1995; Mouassite *et al.*, 2000). Während der Zellteilung zeigen *scw3* Δ -Zellen Defekte in späten Schritten der Septumbildung (Cappellaro *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass die verspätete Bildung des Septums die Ursache für die beobachtete Verdopplung der Chromosomen ist (Mouassite *et al.*, 2000). Die Reduktion der Häufigkeit der *SIM1* und *SCW3* mRNAs gemeinsam mit einer möglicherweise durch Scp160p-Verlust induzierten Missregulation der verbleibenden mRNA könnte zu einer reduzierten Menge von funktionellem Sim1p und/oder Scw3p führen. Ein solches Modell wird durch die Mikroarray-Daten gestützt und könnte die experimentell beobachtete DNA-Verdopplung nach Verlust von Scp160p schlüssig erklären.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zum Einfluss von Scp160p auf den mRNA-Metabolismus, dass Scp160p kein genereller Transkriptions- oder mRNA-Stabilitätsfaktor ist. Vielmehr deuten die verfügbaren Daten beider Mikroarray-Experimente darauf hin, dass eine Depletion von Scp160p Einfluss auf die Häufigkeit und/oder Qualität einer definierten Gruppe von mRNAs hat. Diese mRNAs kodieren bevorzugt für Proteine, die in den sekretorischen Weg eingehen. Insbesondere betrifft eine Scp160p-Depletion mRNAs von extrazellulären Proteinen, Zellwand- und Plasmamembran-Proteinen sowie Untereinheiten von membranständigen Multiproteinkomplexen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zuvor diskutierten Daten, die zeigen, dass Scp160p vorwiegend am ER lokalisiert ist und dort spezifisch mit einer Subfraktion von mRNA-Ribosomen-Komplexen interagiert. Hinweise auf die funktionelle Relevanz der Bindung von Scp160p an diese Substrat-mRNAs geben die bevorzugte Assoziation von Scp160p mit *schweren* Polysomen sowie die hohe Expression der Scp160p-homologen Proteine in Hühner- und Säuger-Gewebe mit hoher sekretorischer Aktivität. Diese deuten darauf hin, dass Scp160p ein Effizienzfaktor bei der Regulation der Translation spezifisch gebundener mRNAs darstellt. Aus der Verbindung von Mikroarray- und Northern-Blot-Experimenten ergibt sich ein Modell, nach dem eine solche Translationsmodulation durch eine lokalisations- und Scp160p-abhängige Veränderung der mRNA-Qualität vermittelt werden könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mitglieder der konservierten Vigilin-Proteinfamilie zeichnen sich durch ihren modularen Aufbau aus 14-15 KH-Domänen aus, die eine RNA-Bindung vermitteln können. Aufgrund von Untersuchungen in unterschiedlichen eukaryontischen Modellsystemen wurde ihnen eine Bedeutung in verschiedenen funktionellen Zusammenhängen wie Zellaktivierung, Proteinsynthese und -Sekretion, mRNA- und tRNA-Metabolismus, Funktion von Heterochromatin sowie Teilung von ER- und Kernmembranen zugeordnet.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Scp160p, des Vertreters der Vigilin-Familie in *Saccharomyces cerevisiae*. In Hefe führt der Verlust von funktionellem Scp160p irreversibel zu pleiotrophen Phänotypen wie anormalem Erscheinungsbild der Zellen, Verdopplung der chromosomalen DNA, einer verringerten Lebensfähigkeit der Zellen und einer unregelmäßigen Verteilung genetischer Marker beim Kreuzen von Stämmen. Durch Fluoreszenzmikroskopie und Zellfraktionierung konnte nachgewiesen werden, dass *in vivo* der Großteil von Scp160p mit ER-Membranen interagiert. Eine kleinere Fraktion findet sich im Zytoplasma. Sowohl an der ER-Membran als auch im Zytosol assoziiert Scp160p mit Polysomen. Diese Interaktion benötigt die Anwesenheit von mRNA, ist sättigbar und *in vivo* spezifisch für eine Subfraktion von mRNA-Ribosomen-Komplexen. Scp160p wird tubulinabhängig vom Zytoplasma an die Membran transportiert. Nach Depolymerisation von Mikrotubuli ist die Assoziation von Scp160p mit der ER-Membran abhängig von aktiver Translation. Die beiden C-terminalen KH-Domänen von Scp160p werden zur Interaktion mit Polysomen, nicht jedoch zur Komplementation des Chromosomenverdopplungs-Phänotyps der *scp160Δ*-Mutante benötigt. Die Aminosäuren 98-142 beinhalten ein Signal, das den aktiven und Ran-abhängigen Kernimport eines 2xGFP-Reporters vermittelt. Im Gesamtprotein wird die N-terminale Kernimport-Aktivität durch Beiträge C-terminaler Domänen abgeschirmt. Unter optimalen Wachstumsbedingungen im Labor gelangt Scp160p daher nicht in den Zellkern.

Mikroarray-Experimente zeigten, dass Depletion von Scp160p zu charakteristischen Veränderungen im Transkriptom und zu einer Verschiebung spezifischer mRNA-Signale zwischen einer membranangereicherten und einer zytosolischen Fraktion führt. Diese Veränderungen betreffen insbesondere mRNAs, die für Proteine kodieren, die in den sekretorischen Weg eingehen. Die Ergebnisse der Mikroarray-Experimente geben im Zusammenhang mit der bevorzugten Assoziation von Scp160p mit membrangebundenen Polysomen Hinweise darauf, dass Scp160p als Effizienzfaktor eine Rolle bei der Translation einer definierten Gruppe sekretierter und membrangebundener Proteine spielt.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
α	gegen
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
cpm	Zählereignisse pro Minute (counts per minute)
CSM	Synthetisches Komplettmedium (complete synthetic medium)
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
dATP	desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	desoxy-Cytosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes (double distilled) Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
depl.	Scp160p-depletiert
dGTP	desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
DIC	Interferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dsRBD	doppelsträngige RNA-bindende Domäne
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymosin-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Extraktionspuffer
ECL	verbesserte Chemolumineszenz (enhanced chemoluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
evlt.	eventuell
FACS	fluorescence-assisted cell sorting
fmol	Femtomol
FOA	5'-Fluorotric Acid
g	Erdbeschleunigung/ Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austausch-Faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
h	Stunde (hour)
HA	Hämagglutinin
HC	Hartwell-Complete (synthetisches Hefemedium)
HCl	Salzsäure (Hydrochlorid)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure
hnRNP	heterogener nukleärer Ribonukleoprotein-Partikel
IgG	Immunoglobulin G
Int.	Integration
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP K-Homologie
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertrami

Abkürzung	Bedeutung
μCi	Mikro-Curie
μF	Mikro-Farad
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
M	Marker/ Molar
MA	Membrananreicherung
MCS	DNA-Sequenz mit vielen Restriktionsschnittstellen (multiple cloning site)
MDa	Megadalton
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MIPS	Munich Information Center for Protein Sequences
ml	Mililiter
mM	milimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propane-Sulfonsäure
M _r	relative molare Masse
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mRNP	mRNA enthaltender Ribonukleoprotein Partikel
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs
NES	Kernexport-Signal (nuclear export signal)
ng	Nanogramm
NLS	Kernimport-Signal (nuclear localization signal)
nt	Nukleotid(e)
Ω	Ohm
OAc	Acetat
OD	optische Dichte
OD ₂₅₄	optische Dichte bei 254nm
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
P10	10000g-Sediment
P18	18000g-Sediment
P200	200000g-Sediment
P6	6000g-Sediment
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE-PAT	rapid amplification of cDNA-ends - poly(A)-tail
Ran	Ras-verwandtes nukleäres Protein (Ras-related nuclear protein)
RBD	RNA-bindende Domäne
RGG	RNA-bindende Domäne mit Arginin-Glycin-Glycin-Wiederholungen
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein Partikel
RQ	Regulationsquotient
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RRM	RNA-recognition motif
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomces cerevisiae</i>
S1200	1200g-Überstand
S18	18000g-Überstand
S200	200000g-Überstand
S25	25000g-Überstand
S6	6000g-Überstand

Abkürzung	Bedeutung
Scp160p	<i>S.cerevisiae</i> -protein involved in control of ploidity ($M_r \approx 160\text{kDa}$)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunde(n)
sek.	sekretorischer Weg
SGD	Saccharomyces Genome Database
SSC	sodium chloride/sodium citrate
Stdv	Standardabweichung
Taq	<i>Thermococcus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure (trichloroacetic acid)
TE	Tris/EDTA
TM	Transmembran-Domäne(n)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ts	Temperatur-sensitiv
U	Einheit für katalytische Aktivität (unit)
UE	Untereinheit
UTR	nichttranslatierte Region (untranslated region)
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
VQ	Verschiebungsquotient
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WT	Wildtyp
YNB	Stickstoffhaltiges Hefe-Grundmedium (yeast nitrogen base)
YPD	glukosehaltiges Vollmedium für Hefe

Fachausdrücke:

Häufig im Laborjargon verwendete Fachausdrücke wie Assay, Kit, Inkubation, Template, Primer etc. wurden nicht übersetzt und in dieser Arbeit ohne Anführungszeichen verwendet.

7 LITERATUR

7.1 veröffentlichte Teile dieser Arbeit

Frey, S., Pool, M. & Seedorf, M. (2001)

Scp160p, an RNA-binding, Polysome-associated Protein, Localizes to the Endoplasmic Reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a Microtubule-dependent Manner

J Biol Chem **276**, Seiten 15905-15912.

Bittins, M., Frey, S., Baum, S., Pool, M., Bach, U., Dobberstein, B. & Seedorf, M. (2001)

The signalling platform protein Asc1p/RACK1 is associated with Scp160p/vigilin at the ribosome

zur Veröffentlichung eingereicht

7.2 zitierter Literatur

Adams A., Gottschling D. & Sterns T. (1997)

Methods in yeast genetics: Cold Spring Harbour Laboratory Press

Aebi M., Clark M.W., Vijayraghavan U. & Abelson J. (1990)

A yeast mutant, PRP20, altered in mRNA metabolism and maintenance of the nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene RCC1 which is involved in the control of chromosome condensation

Mol Gen Genet **224**, Seiten 72-80.

Amberg D.C., Fleischmann M., Stagljar I., Cole C.N. & Aebi M. (1993)

Nuclear PRP20 protein is required for mRNA export

Embo J **12**, Seiten 233-241.

Ambros V. (2001)

microRNAs: tiny regulators with great potential

Cell **107**, Seiten 823-826.

Antic D. & Keene J.D. (1997)

Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression

Am J Hum Genet **61**, Seiten 273-278.

Antic D., Lu N. & Keene J.D. (1999)

ELAV tumor antigen, hel-N1, increases translation of neurofilament M mRNA and induces formation of neurites in human teratocarcinoma cells

Genes Dev **13**, Seiten 449-461

Arning S., Gruter P., Bilbe G. & Kramer A. (1996)

Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA

Rna **2**, Seiten 794-810

Audic Y., Omilli F. & Osborne H.B. (1997)

Postfertilization deadenylation of mRNAs in *Xenopus laevis* embryos is sufficient to cause their degradation at the blastula stage

Mol Cell Biol **17**, Seiten 209-218.

Ayscough K.R. & Drubin D.G. (1998)

A role for the yeast actin cytoskeleton in pheromone receptor clustering and signalling
Curr Biol 8, Seiten 927-930

Baehrecke E.H. (1997)

who encodes a KH RNA binding protein that functions in muscle development
Development 124, Seiten 1323-1332

Bakheet T., Frevel M., Williams B.R., Greer W. & Khabar K.S. (2001)

ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins
Nucleic Acids Res 29, Seiten 246-254.

Barkoff A.F., Dickson K.S., Gray N.K. & Wickens M. (2000)

Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation
Dev Biol 220, Seiten 97-109.

Bashirullah A., Cooperstock R.L. & Lipshitz H.D. (1998)

RNA localization in development
Annu Rev Biochem 67, Seiten 335-394

Bashirullah A., Halsell S.R., Cooperstock R.L., Kloc M., Karaiskakis A., Fisher W.W., Fu W., Hamilton J.K., Etkin L.D. & Lipshitz H.D. (1999)

Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*
Embo J 18, Seiten 2610-2620

Baudin A., Ozier-Kalogeropoulou O., Denouel A., Lacroute F. & Cullin C. (1993)

A simple and efficient method of direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*
Nuc. Acids. Res. 21, Seiten 3329-3330

Beelman C.A. & Parker R. (1994)

Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA
J Biol Chem 269, Seiten 9687-9692.

Beelman C.A., Stevens A., Caponigro G., LaGrande T.E., Hatfield L., Fortner D.M. & Parker R. (1996)

An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover
Nature 382, Seiten 642-646.

Berglund J.A., Fleming M.L. & Rosbash M. (1998)

The KH domain of the branchpoint sequence binding protein determines specificity for the pre-mRNA branchpoint sequence
Rna 4, Seiten 998-1006

Bergsten S.E. & Gavis E.R. (1999)

Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA
Development 126, Seiten 659-669

Bernstein P., Peltz S.W. & Ross J. (1989)

The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro
Mol Cell Biol 9, Seiten 659-670.

Bischoff F.R., Krebber H., Kempf T., Hermes I. & Ponstingl H. (1995)

Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport
Proc Natl Acad Sci U S A 92, Seiten 1749-1753.

Bittins M. (2002)

Identifizierung von Scp160p-assoziierten Proteinen durch chemisches Crosslinken und deren funktionelle Charakterisierung
Diplomarbeit, Zentrum für Molekulare Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Blobel G. (1971)

Isolation of a 5S RNA-protein complex from mammalian ribosomes
Proc Natl Acad Sci U S A 68, Seiten 1881-1885

Bobola N., Jansen R.P., Shin T.H. & Nasmyth K. (1996)

Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells.
Cell 84, Seiten 699-709

Bomsztyk K., Van S.I., Suzuki H., Denisenko O. & Ostrowski J. (1997)

Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein
FEBS Lett 403, Seiten 113-115

Bouvet P., Omilli F., Arlot-Bonnemains Y., Legagneux V., Roghi C., Bassez T. & Osborne H.B. (1994)

The deadenylation conferred by the 3' untranslated region of a developmentally controlled mRNA in Xenopus embryos is switched to polyadenylation by deletion of a short sequence element
Mol Cell Biol 14, Seiten 1893-1900.

Brown V., Jin P., Ceman S., Darnell J.C., O'Donnell W.T., Tenenbaum S.A., Jin X., Feng Y., Wilkinson K.D., Keene J.D., Darnell R.B. & Warren S.T. (2001)

Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome
Cell 107, Seiten 477-487.

Buckanovich R.J. & Darnell R.B. (1997)

The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo
Mol Cell Biol 17, Seiten 3194-3201

Burd C.G. & Dreyfuss G. (1994)

Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins
Science 265, Seiten 615-621

Cappellaro C., Mersa V. & Tanner W. (1998)

New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating
J Bacteriol 180, Seiten 5030-5037.

Cavallaro S., Meiri N., Yi C.L., Musco S., Ma W., Goldberg J. & Alkon D.L. (1997)

Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting

Proc Natl Acad Sci U S A 94, Seiten 9669-9673.

Cavallaro S., Schreurs B.G., Zhao W., D'Agata V. & Alkon D.L. (2001)

Gene expression profiles during long-term memory consolidation

Eur J Neurosci 13, Seiten 1809-1815.

Chakravarti D., Maiti T. & Maitra U. (1993)

Isolation and immunochemical characterization of eukaryotic translation initiation factor 5 from *Saccharomyces cerevisiae*

J Biol Chem 268, Seiten 5754-5762.

Chen C.Y. & Shyu A.B. (1995)

AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation

Trends Biochem Sci 20, Seiten 465-470.

Cherry J.M., Ball C., Dolinski K., Dwight S., Harris M., Matrese J. C., Sherlock G., Binkley G., Jin H., Weng S., and Botstein D. (2002)

"*Saccharomyces* Genome Database"

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/> (Mai 2002)

Choi S.B., Wang C., Muench D.G., Ozawa K., Franceschi V.R., Wu Y. & Okita T.W. (2000)

Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains

Nature 407, Seiten 765-767.

Corral-Debrinski M., Blugeon C. & Jacq C. (2000)

In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria

Mol Cell Biol 20, Seiten 7881-7892.

Cortes A. & Azorin F. (2000)

DDP1, a heterochromatin-associated multi-KH-domain protein of *Drosophila melanogaster*, interacts specifically with centromeric satellite DNA sequences

Mol Cell Biol 20, Seiten 3860-3869

Cortes A., Huertas D., Fanti L., Pimpinelli S., Marsellach F.X., Pina B. & Azorin F. (1999)

DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy

Embo J 18, Seiten 3820-3833

Cote C.A., Gautreau D., Denegre J.M., Kress T.L., Terry N.A. & Mowry K.L. (1999)

A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization

Mol Cell 4, Seiten 431-437

Cunningham K.S., Dodson R.E., Nagel M.A., Shapiro D.J. & Schoenberg D.R. (2000)

Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1

Proc Natl Acad Sci U S A 97, Seiten 12498-12502

Dahanukar A. & Wharton R.P. (1996)

The Nanos gradient in Drosophila embryos is generated by translational regulation
Genes Dev 10, Seiten 2610-2620.

Dahmann C., Diffley J.F. & Nasmyth K.A. (1995)

S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state
Curr Biol 5, Seiten 1257-1269.

De Boulle K., Verkerk A.J., Reyniers E., Vits L., Hendrickx J., Van Roy B., Van den Bos F., de Graaff E., Oostra B.A. & Willems P.J. (1993)

A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation
Nat Genet 3, Seiten 31-35.

de Moor C.H. & Richter J.D. (1999)

Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA
Embo J 18, Seiten 2294-2303.

de Moor C.H. & Richter J.D. (2001)

Translational control in vertebrate development
Int Rev Cytol 203, Seiten 567-608

Deshler J.O., Highett M.I., Abramson T. & Schnapp B.J. (1998)

A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates
Curr Biol 8, Seiten 489-496

Deshler J.O., Highett M.I. & Schnapp B.J. (1997)

Localization of Xenopus Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum
Science 276, Seiten 1128-1131

Diehn M., Eisen M.B., Botstein D. & Brown P.O. (2000)

Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays
Nat Genet 25, Seiten 58-62

Ding D., Parkhurst S.M., Halsell S.R. & Lipshitz H.D. (1993)

Dynamic Hsp83 RNA localization during Drosophila oogenesis and embryogenesis
Mol Cell Biol 13, Seiten 3773-3781.

Dingwall C. & Laskey R.A. (1991)

Nuclear targeting sequences--a consensus?
Trends Biochem Sci 16, Seiten 478-481.

Dingwall C. & Laskey R.A. (1998)

Nuclear import: a tale of two sites
Curr Biol 8, Seiten R922-924.

Dix D.J., Lin P.N., McKenzie A.R., Walden W.E. & Theil E.C. (1993)

The influence of the base-paired flanking region on structure and function of the ferritin mRNA iron regulatory element
J Mol Biol 231, Seiten 230-240

Dodson R.E. & Shapiro D.J. (1997)

Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'-untranslated region-binding protein

J Biol Chem **272**, Seiten 12249-12252

Dreyfuss G., Kim V.N. & Kataoka N. (2002)

Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry

Nat Rev Mol Cell Biol **3**, Seiten 195-205.

Driever W. & Nüsslein-Volhard C. (1988)

The bicoid protein determines position in the Drosophila embryo in a concentration-dependent manner

Cell **54**, Seiten 95-104.

Du L.L. & Novick P. (2002)

Pag1p, a novel protein associated with protein kinase Cbk1p, is required for cell morphogenesis and proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*

Mol Biol Cell **13**, Seiten 503-514.

Engbrecht J. & Roeder G.S. (1990)

MER1, a yeast gene required for chromosome pairing and genetic recombination, is induced in meiosis

Mol Cell Biol **10**, Seiten 2379-2389

Ephrussi A., Dickinson L.K. & Lehmann R. (1991)

Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos

Cell **66**, Seiten 37-50

Ephrussi A. & Lehmann R. (1992)

Induction of germ cell formation by oskar

Nature **358**, Seiten 387-392

Fan X.C. & Steitz J.A. (1998)

Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs

Embo J **17**, Seiten 3448-3460.

Ford L.P., Watson J., Keene J.D. & Wilusz J. (1999)

ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system

Genes Dev **13**, Seiten 188-201

Frey S., Pool M. & Seedorf M. (2001)

Scp160p, an RNA-binding, Polysome-associated Protein, Localizes to the Endoplasmic Reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a Microtubule-dependent Manner

J Biol Chem **276**, Seiten 15905-15912.

Gan Y. (1993)

[Localization of vigilin and type I, II procollagen mRNAs in chick embryos by in situ hybridization]

Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao **15**, Seiten 245-249.

Garcia-Mena J., Das A., Sanchez-Trujillo A., Portier C. & Montanez C. (1999)

A novel mutation in the KH domain of polynucleotide phosphorylase affects autoregulation and mRNA decay in *Escherichia coli*

Mol Microbiol **33**, Seiten 235-248.

Gavis E.R. & Lehmann R. (1992)

Localization of nanos RNA controls embryonic polarity

Cell **71**, Seiten 301-313.

Gavis E.R. & Lehmann R. (1994)

Translational regulation of nanos by RNA localization

Nature **369**, Seiten 315-318

Gavis E.R., Lunsford L., Bergsten S.E. & Lehmann R. (1996)

A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA

Development **122**, Seiten 2791-2800

Gibson T.J., Thompson J.D. & Heringa J. (1993)

The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid

FEBS Lett **324**, Seiten 361-366

Gietz D., St Jean A., Woods R.A. & Schiestl R.H. (1992)

Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells

Nucleic Acids Res **20**, Seiten 1425.

Gonzalez I., Buonomo S.B., Nasmyth K. & von Ahsen U. (1999)

ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation

Curr Biol **9**, Seiten 337-340

Görlich D., Hartmann E., Prehn S. & Rapoport T.A. (1992a)

A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation

Nature **357**, Seiten 47-52.

Görlich D. & Kutay U. (1999)

Transport between the cell nucleus and the cytoplasm

Annu Rev Cell Dev Biol **15**, Seiten 607-660

Görlich D., Prehn S., Hartmann E., Kalies K.U. & Rapoport T.A. (1992b)

A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation

Cell **71**, Seiten 489-503.

Gorsch L.C., Dockendorff T.C. & Cole C.N. (1995)

A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes

J Cell Biol **129**, Seiten 939-955

Graham L.A., Hill K.J. & Stevens T.H. (1998)

Assembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase occurs in the endoplasmic reticulum and requires a Vma12p/Vma22p assembly complex

J Cell Biol **142**, Seiten 39-49

Gray N.K. & Hentze M.W. (1994)

Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs

Embo J 13, Seiten 3882-3891

Grishin N.V. (2001)

KH domain: one motif, two folds

Nucleic Acids Res 29, Seiten 638-643.

Grünweller A., Purschke W.G., Kugler S., Kruse C. & Muller P.K. (1997)

Chicken vigilin gene: a distinctive pattern of hypersensitive sites is characteristic for its transcriptional activity

Biochem J 326, Seiten 601-607.

Gunkel N., Yano T., Markussen F.H., Olsen L.C. & Ephrussi A. (1998)

Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA

Genes Dev 12, Seiten 1652-1664

Guthrie C. & Fink G.R. (1991)

Guide to yeast genetics and molecular biology

Methods Enzymol. 194, Seiten 3-37

Han J.W., Park J.H., Kim M. & Lee J. (1997)

mRNAs for microtubule proteins are specifically colocalized during the sequential formation of basal body, flagella, and cytoskeletal microtubules in the differentiation of *Naegleria gruberi*

J Cell Biol 137, Seiten 871-879

Havin L., Git A., Elisha Z., Oberman F., Yaniv K., Schwartz S.P., Standart N. & Yisraeli J.K. (1998)

RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament- based RNA localization

Genes Dev 12, Seiten 1593-1598

Henkel B., Schmidt C., Zorbas H., Poschl E., Gloe T.R., Purschke W.G. & Muller P.K. (1992)

Chicken vigilin gene organization and expression pattern. The domain structure of the protein is reflected by the exon structure

Eur J Biochem 209, Seiten 321-328.

Hentze M.W. & Kuhn L.C. (1996)

Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress

Proc Natl Acad Sci U S A 93, Seiten 8175-8182

Hershey J.W. (1990)

Overview: phosphorylation and translation control

Enzyme 44, Seiten 17-27

Hill K. & Cooper A.A. (2000)

Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system

Embo J 19, Seiten 550-561

Hoek K.S., Kidd G.J., Carson J.H. & Smith R. (1998)

hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA
Biochemistry 37, Seiten 7021-7029

Hopper A.K. & Banks F. (1978)

A yeast mutant which accumulates precursor tRNAs
Cell 14, Seiten 211-219.

Hopper A.K., Schultz L.D. & Shapiro R.A. (1980)

Processing of intervening sequences: a new yeast mutant which fails to excise intervening sequences from precursor tRNAs
Cell 19, Seiten 741-751.

Hsu C.L. & Stevens A. (1993)

Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure
Mol Cell Biol 13, Seiten 4826-4835.

Hurt E., Strasser K., Segref A., Bailer S., Schlaich N., Presutti C., Tollervey D. & Jansen R. (2000)

Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts
J Biol Chem 275, Seiten 8361-8368

Irie K., Tadauchi T., Takizawa P.A., Vale R.D., Matsumoto K. & Herskowitz I. (2002)

The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast
Embo J 21, Seiten 1158-1167.

Isaacs W.B., Cook R.K., Van Atta J.C., Redmond C.M. & Fulton A.B. (1989)

Assembly of vimentin in cultured cells varies with cell type
J Biol Chem 264, Seiten 17953-17960.

Izaurrealde E., Kutay U., von Kobbe C., Mattaj I.W. & Görlich D. (1997)

The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus
Embo J 16, Seiten 6535-6547.

Jacobson A. (1996)

Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model
 in **Translational Control**,
 Herausgegeben von M.M. Hershey JWB, Sonenberg N., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press Seiten 451-480.

Jain R.G., Andrews L.G., McGowan K.M., Pekala P.H. & Keene J.D. (1997)

Ectopic expression of Hel-N1, an RNA-binding protein, increases glucose transporter (GLUT1) expression in 3T3-L1 adipocytes
Mol Cell Biol 17, Seiten 954-962.

Jansen R.P., Dowzer C., Michaelis C., Galova M. & Nasmyth K. (1996)

Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins
Cell 84, Seiten 687-697

Jensen K.B., Musunuru K., Lewis H.A., Burley S.K. & Darnell R.B. (2000)

The tetranucleotide UCAY directs the specific recognition of RNA by the Nova K-homology 3 domain
Proc Natl Acad Sci U S A **97**, Seiten 5740-5745

Johnstone O. & Lasko P. (2001)

Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos
Annu Rev Genet **35**, Seiten 365-406

Jones A.R. & Schedl T. (1995)

Mutations in *gld-1*, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src- associated protein Sam68
Genes Dev **9**, Seiten 1491-1504.

Kadowaki T., Goldfarb D., Spitz L.M., Tartakoff A.M. & Ohno M. (1993)

Regulation of RNA processing and transport by a nuclear guanine nucleotide release protein and members of the Ras superfamily
Embo J **12**, Seiten 2929-2937.

Kahana J.A., Schnapp B.J. & Silver P.A. (1995)

Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, Seiten 9707-9711

Kahana J.A. & Silver P.A. (1996)

Use of *A. victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics *in vivo*.
 in **Current Protocols in Molecular Biology**,
 Herausgegeben von F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.E. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. New York: John Wiley and Sons, Inc. Seiten 9.6.13-19.16.19.

Kanamori H., Dodson R.E. & Shapiro D.J. (1998)

In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi- KH-domain protein
Mol Cell Biol **18**, Seiten 3991-4003

Kiebler M.A., Hemraj I., Verkade P., Kohrmann M., Fortes P., Marion R.M., Ortin J. & Dotti C.G. (1999)

The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport
J Neurosci **19**, Seiten 288-297

Kim-Ha J., Kerr K. & Macdonald P.M. (1995)

Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential
Cell **81**, Seiten 403-412

Kim-Ha J., Smith J.L. & Macdonald P.M. (1991)

oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte
Cell **66**, Seiten 23-35

Kim-Ha J., Webster P.J., Smith J.L. & Macdonald P.M. (1993)

Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA
Development **119**, Seiten 169-178

Kimball S.R. (2001)

Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells
Prog Mol Subcell Biol **26**, Seiten 155-184

Kimball S.R. (2002)

Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids

J Nutr 132, Seiten 883-886

Klinger M.H. & Kruse C. (1996)

Immunocytochemical localization of vigilin, a tRNA-binding protein, after cell fractionation and within the exocrine pancreatic cell of the rat

Anat Anz 178, Seiten 331-335

Kruse C., Emmrich J., Rumpel E., Klinger M.H., Grünweller A., Rohwedel J., Krammer H.J., Kuhnel W. & Muller P.K. (1998a)

Production of trypsin by cells of the exocrine pancreas is paralleled by the expression of the KH protein vigilin

Exp Cell Res 239, Seiten 111-118

Kruse C., Grünweller A., Notbohm H., Kugler S., Purschke W.G. & Muller P.K. (1996)

Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH- multidomain protein vigilin

Biochem J 320, Seiten 247-252

Kruse C., Grünweller A., Willkomm D.K., Pfeiffer T., Hartmann R.K. & Muller P.K. (1998b)

tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha

Biochem J, Seiten 615-621

Kruse C., Willkomm D.K., Grünweller A., Vollbrandt T., Sommer S., Busch S., Pfeiffer T., Brinkmann J., Hartmann R.K. & Muller P.K. (2000)

Export and transport of tRNA are coupled to a multi-protein complex

Biochem J 346, Seiten 107-115

Kugler S., Grünweller A., Probst C., Klinger M., Muller P.K. & Kruse C. (1996)

Vigilin contains a functional nuclear localisation sequence and is present in both the cytoplasm and the nucleus

FEBS Lett 382, Seiten 330-334

Kyhse-Andersen J. (1984)

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose

J Biochem Biophys Methods 10, Seiten 203-209.

L'Ecuyer T.J., Noller J.A. & Fulton A.B. (1998)

Assembly of tropomyosin isoforms into the cytoskeleton of avian muscle cells

Pediatr Res 43, Seiten 813-822.

Laemmli U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 227, Seiten 680-685.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. & Tuschl T. (2001)

Identification of novel genes coding for small expressed RNAs

Science 294, Seiten 853-858.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W. & Tuschl T. (2002)

Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse

Curr Biol 12, Seiten 735-739.

LaGrandeur T.E. & Parker R. (1998)

Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme

Embo J 17, Seiten 1487-1496.

Lang B.D. & Fridovich-Keil J.L. (2000)

Scp160p, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast

Nucleic Acids Res 28, Seiten 1576-1584

Lang B.D., Li A., Black-Brewster H.D. & Fridovich-Keil J.L. (2001)

The brefeldin A resistance protein Bfr1p is a component of polyribosome-associated mRNP complexes in yeast

Nucleic Acids Res 29, Seiten 2567-2574.

Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G. & Bartel D.P. (2001)

An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*

Science 294, Seiten 858-862.

Lee R.C. & Ambros V. (2001)

An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*

Science 294, Seiten 862-864.

Lee R.C., Feinbaum R.L. & Ambros V. (1993)

The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*

Cell 75, Seiten 843-854.

Legagneux V., Bouvet P., Omilli F., Chevalier S. & Osborne H.B. (1992)

Identification of RNA-binding proteins specific to *Xenopus* egg maternal mRNAs: association with the portion of *Eg2* mRNA that promotes deadenylation in embryos

Development 116, Seiten 1193-1202.

Legagneux V., Omilli F. & Osborne H.B. (1995)

Substrate-specific regulation of RNA deadenylation in *Xenopus* embryo and activated egg extracts

Rna 1, Seiten 1001-1008.

Leng X.H., Manolson M.F. & Forgac M. (1998)

Function of the COOH-terminal domain of Vph1p in activity and assembly of the yeast V-ATPase

J Biol Chem 273, Seiten 6717-6723

Levadoux M., Mahon C., Beattie J.H., Wallace H.M. & Hesketh J.E. (1999)

Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton

J Biol Chem 274, Seiten 34961-34966.

Lewis H.A., Musunuru K., Jensen K.B., Edo C., Chen H., Darnell R.B. & Burley S.K. (2000)

Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome

Cell 100, Seiten 323-332

Lin Q., Taylor S.J. & Shalloway D. (1997)

Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains

J Biol Chem **272**, Seiten 27274-27280

Lipshitz H.D. & Smibert C.A. (2000)

Mechanisms of RNA localization and translational regulation

Curr Opin Genet Dev **10**, Seiten 476-488

Long R.M., Singer R.H., Meng X., Gonzalez I., Nasmyth K. & Jansen R.P. (1997)

Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA

Science **277**, Seiten 383-387

Ma W.J., Chung S. & Furneaux H. (1997)

The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA

Nucleic Acids Res **25**, Seiten 3564-3569.

Mahone M., Saffman E.E. & Lasko P.F. (1995)

Localized Bicardal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1

Embo J **14**, Seiten 2043-2055

Manolson M.F., Proteau D. & Jones E.W. (1992a)

Evidence for a conserved 95-120 kDa subunit associated with and essential for activity of V-ATPases

J Exp Biol **172**, Seiten 105-112

Manolson M.F., Proteau D., Preston R.A., Stenbit A., Roberts B.T., Hoyt M.A., Preuss D., Mulholland J., Botstein D. & Jones E.W. (1992b)

The VPH1 gene encodes a 95-kDa integral membrane polypeptide required for in vivo assembly and activity of the yeast vacuolar H(+)-ATPase

J Biol Chem **267**, Seiten 14294-14303

Marion R.M., Fortes P., Beloso A., Dotti C. & Ortin J. (1999)

A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum

Mol Cell Biol **19**, Seiten 2212-2219

McCarthy J. (1998)

Posttranscriptional control of gene expression in yeast

Microbiol Mol Biol Rev **62**, Seiten 1492-1553

Mewes H.W., Frishman D., Guldener U., Mannhaupt G., Mayer K., Mokrejs M., Morgenstern B., Munsterkotter M., Rudd S. & Weil B. (2002a)

Datenbank mit subzellulären Lokalisationen von Hefe-Proteinen

<ftp://ftpmips.gsf.de/yeast/> (Juli 2002)

Mewes H.W., Frishman D., Guldener U., Mannhaupt G., Mayer K., Mokrejs M., Morgenstern B., Munsterkotter M., Rudd S. & Weil B. (2002b)

MIPS: a database for genomes and protein sequences

Nucleic Acids Res **30**, Seiten 31-34.

Michael W.M., Eder P.S. & Dreyfuss G. (1997)

The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein

Embo J 16, Seiten 3587-3598

Mouassite M., Camougrand N., Schwob E., Demaison G., Laclau M. & Guerin M. (2000)

The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation

Yeast 16, Seiten 905-919.

Muench D.G., Chuong S.D., Franceschi V.R. & Okita T.W. (2000)

Developing prolamine protein bodies are associated with the cortical cytoskeleton in rice endosperm cells

Planta 211, Seiten 227-238

Muench D.G., Wu Y., Coughlan S.J. & Okita T.W. (1998)

Evidence for a Cytoskeleton-Associated Binding Site Involved in Prolamine mRNA Localization to the Protein Bodies in Rice Endosperm Tissue

Plant Physiol 116, Seiten 559-569

Nandabalan K. & Roeder G.S. (1995)

Binding of a cell-type-specific RNA splicing factor to its target regulatory sequence

Mol Cell Biol 15, Seiten 1953-1960.

Natarajan K., Meyer M.R., Jackson B.M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A.G. & Marton M.J. (2001)

Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast

Mol Cell Biol 21, Seiten 4347-4368

Neu-Yilik G., Zorbas H., Gloe T.R., Raabe H.M., Hopp-Christensen T.A. & Muller P.K. (1993)

Vigilin is a cytoplasmic protein. A study on its expression in primary cells and in established cell lines of different species

Eur J Biochem 213, Seiten 727-736

Nolan R.D. & Arnstein H.R. (1969)

The dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes into subparticles active in protein synthesis

Eur J Biochem 10, Seiten 96-101

Nonet M., Scafe C., Sexton J. & Young R. (1987a)

Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis

Mol Cell Biol 7, Seiten 1602-1611

Nonet M., Scafe C., Sexton J. & Young R. (1987b)

Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis

Mol Cell Biol 7, Seiten 1602-1611.

Novick P., Field C. & Schekman R. (1980)

Identification of 23 complementation groups required for post- translational events in the yeast secretory pathway

Cell 21, Seiten 205-215.

Olsen P.H. & Ambros V. (1999)

The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation

Dev Biol **216**, Seiten 671-680.

Ostareck D.H., Ostareck-Lederer A., Shatsky I.N. & Hentze M.W. (2001)

Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining

Cell **104**, Seiten 281-290.

Ostareck D.H., Ostareck-Lederer A., Wilm M., Thiele B.J., Mann M. & Hentze M.W. (1997)

mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end

Cell **89**, Seiten 597-606

Ostareck-Lederer A., Ostareck D.H., Standart N. & Thiele B.J. (1994)

Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region

Embo J **13**, Seiten 1476-1481.

Paillard L., Omilli F., Legagneux V., Bassez T., Maniey D. & Osborne H.B. (1998)

EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos

Embo J **17**, Seiten 278-287.

Peng S.S., Chen C.Y., Xu N. & Shyu A.B. (1998)

RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein

Embo J **17**, Seiten 3461-3470.

Pestova T.V., Lomakin I.B., Lee J.H., Choi S.K., Dever T.E. & Hellen C.U. (2000)

The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B

Nature **403**, Seiten 332-335

Plenz G., Gan Y., Raabe H.M. & Muller P.K. (1993)

Expression of vigilin in chicken cartilage and bone

Cell Tissue Res **273**, Seiten 381-389

Plenz G., Kugler S., Schnittger S., Rieder H., Fonatsch C. & Muller P.K. (1994)

The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern

Hum Genet **93**, Seiten 575-582

Ponka P., Beaumont C. & Richardson D.R. (1998)

Function and regulation of transferrin and ferritin

Semin Hematol **35**, Seiten 35-54

Preuss D., Mulholland J., Kaiser C.A., Orlean P., Albright C., Rose M.D., Robbins P.W. & Botstein D. (1991)

Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy

Yeast **7**, Seiten 891-911.

Prinz W.A., Grzyb L., Veenhuis M., Kahana J.A., Silver P.A. & Rapoport T.A. (2000)

Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*
J Cell Biol **150**, Seiten 461-474.

Quattrone A., Pascale A., Nogues X., Zhao W., Gusev P., Pacini A. & Alkon D.L. (2001)

Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins

Proc Natl Acad Sci U S A **98**, Seiten 11668-11673.

Raychaudhuri P., Chaudhuri A. & Maitra U. (1985a)

Eukaryotic initiation factor 5 from calf liver is a single polypeptide chain protein of Mr = 62,000

J Biol Chem **260**, Seiten 2132-2139.

Raychaudhuri P., Chaudhuri A. & Maitra U. (1985b)

Formation and release of eukaryotic initiation factor 2 X GDP complex during eukaryotic ribosomal polypeptide chain initiation complex formation

J Biol Chem **260**, Seiten 2140-2145.

Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R. & Ruvkun G. (2000)

The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*

Nature **403**, Seiten 901-906.

Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B. & Bartel D.P. (2002)

MicroRNAs in plants

Genes Dev **16**, Seiten 1616-1626.

Richter J.D. (1999)

Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond

Microbiol Mol Biol Rev **63**, Seiten 446-456.

Richter J.D. (2000)

Influence of polyadenylation-induced translation on metazoan development and neuronal synaptic function

in **Translational Control of Gene Expression**,

Herausgegeben von N. Sonenberg, J.W.B. Hershey & M.B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press Seiten 785-805.

Rose M.D., Misra L.M. & Vogel J.P. (1989)

KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene

Cell **57**, Seiten 1211-1221

Rose M.D., Novick P., Thomas J.H., Botstein D. & Fink G.R. (1987)

A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector

Gene **60**, Seiten

Ross A.F., Oleynikov Y., Kislauskis E.H., Taneja K.L. & Singer R.H. (1997)

Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein

Mol Cell Biol **17**, Seiten 2158-2165

Rumpel E., Kruse C., Muller P.K. & Kuhnel W. (1996)

Expression of vigilin in the uterus of ovariectomized steroid-treated rats and during the estrous cycle
Anat Anz 178, Seiten 337-344

Sachs A.B. (2000)

Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail.
in **Translational Control of Gene Expression**,
Herausgegeben von N. Sonenberg, J.W. Hershey & M.B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY:
Cold Spring Harbor Lab. Press Seiten 447-465.

Salles F.J., Lieberfarb M.E., Wreden C., Gergen J.P. & Strickland S. (1994)

Coordinate initiation of Drosophila development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs

Science 266, Seiten 1996-1999.

Salles F.J., Richards W.G. & Strickland S. (1999)

Assaying the polyadenylation state of mRNAs
Methods 17, Seiten 38-45.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual
C.Nolan ed 2. Edition, Seiten

Santos-Rosa H., Moreno H., Simos G., Segref A., Fahrenkrog B., Pante N. & Hurt E. (1998)

Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores
Mol Cell Biol 18, Seiten 6826-6838

Schmidt C., Henkel B., Poschl E., Zorbas H., Purschke W.G., Gloe T.R. & Muller P.K. (1992)

Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains
Eur J Biochem 206, Seiten 625-634

Schultz M.C. (1999)

Chromatin assembly in yeast cell-free extracts
Methods 17, Seiten 161-172.

Segref A., Sharma K., Doye V., Hellwig A., Huber J., Luhrmann R. & Hurt E. (1997)

Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores
Embo J 16, Seiten 3256-3271

Sherman F. (1997)

Yeast genetics
in **The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine**,
Herausgegeben von R.A. Meyers. Weinheim, Germany: VCH Pub. Seiten 302-325.

Shulga N., Roberts P., Gu Z., Spitz L., Tabb M.M., Nomura M. & Goldfarb D.S. (1996)

In vivo nuclear transport kinetics in Saccharomyces cerevisiae: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation
J Cell Biol 135, Seiten 329-339.

Siebel C.W., Admon A. & Rio D.C. (1995)

Soma-specific expression and cloning of PSI, a negative regulator of P element pre-mRNA splicing
Genes Dev 9, Seiten 269-283.

Sikorski R.S. & Hieter P. (1989)

A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics 122, Seiten 19-27

Siomi H., Choi M., Siomi M.C., Nussbaum R.L. & Dreyfuss G. (1994)

Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome
Cell 77, Seiten 33-39

Siomi H., Matunis M.J., Michael W.M. & Dreyfuss G. (1993)

The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif
Nucleic Acids Res 21, Seiten 1193-1198

Smibert C.A., Wilson J.E., Kerr K. & Macdonald P.M. (1996)

smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo
Genes Dev 10, Seiten 2600-2609

Smith J.L., Wilson J.E. & Macdonald P.M. (1992)

Overexpression of oskar directs ectopic activation of nanos and presumptive pole cell formation in Drosophila embryos
Cell 70, Seiten 849-859.

Spirin A. (1996)

Masked and translatable messenger ribonucleotides in higher eukaryotes.
in **Translational Control**,
Herausgegeben von M.M. Hershey JWB, Sonenberg N., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press Seiten 319-334.

St. Johnston D., Driever W., Berleth T., Richstein S. & Nüsslein-Volhard C. (1989)

Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte
Development 107, Seiten 13-19

Stade K., Ford C., Guthrie C. & Weis K. (1997a)

Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor
Cell 90, Seiten 1041-1050

Stade K., Ford C.S., Guthrie C. & Weis K. (1997b)

Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor
Cell 90, Seiten 1041-1050.

Stage-Zimmermann T., Schmidt U. & Silver P.A. (2000)

Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo
Mol Biol Cell 11, Seiten 3777-3789.

Stearns T., Hoyt M.A. & Botstein D. (1990)

Yeast mutants sensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function
Genetics 124, Seiten 251-262

Stirling C.J., Rothblatt J., Hosobuchi M., Deshaies R. & Schekman R. (1992)

Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum

Mol Biol Cell 3, Seiten 129-142

Stoltenburg R., Wartmann T., Kunze I. & Kunze G. (1995)

Reliable method to prepare RNA from free and membrane-bound polysomes from different yeast species

Biotechniques 18, Seiten 564-566, 568.

Takizawa P.A., DeRisi J.L., Wilhelm J.E. & Vale R.D. (2000)

Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier

Science 290, Seiten 341-344

Takizawa P.A., Sil A., Swedlow J.R., Herskowitz I. & Vale R.D. (1997)

Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast

Nature 389, Seiten 90-93

Tarun S.Z. & Sachs A.B. (1996)

Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G

Embo J 15, Seiten 7168-7177.

Taura T., Krebber H. & Silver P.A. (1998)

A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export

Proc Natl Acad Sci U S A 95, Seiten 7427-7432.

Thisted T., Lyakhov D.L. & Liebhaber S.A. (2001)

Optimized RNA Targets of Two Closely Related Triple KH Domain Proteins, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K and alpha CP-2KL, Suggest Distinct Modes of RNA Recognition

J Biol Chem 276, Seiten 17484-17496.

Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications

Proc Natl Acad Sci U S A 76, Seiten 4350-4354.

Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T.A., Judson R.S., Knight J.R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S. & Rothberg J.M. (2000)

A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*

Nature 403, Seiten 623-627.

van Rijn H.J., Linnemans W.A. & Boer P. (1975)

Localization of acid phosphatase in protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae*

J Bacteriol 123, Seiten 1144-1149.

Velours G., Boucheron C., Manon S. & Camougrand N. (2002)

Dual cell wall/mitochondria localization of the 'SUN' family proteins

FEMS Microbiol Lett 207, Seiten 165-172.

Veyrune J.L., Carillo S., Vie A. & Blanchard J.M. (1995)

c-fos mRNA instability determinants present within both the coding and the 3' non coding region link the degradation of this mRNA to its translation

Oncogene 11, Seiten 2127-2134.

Vogt N. (2001)

Identifizierung von Komponenten Scp160p-haltiger Komplexe

Diplomarbeit, Zentrum für Molekulare Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Walter P. & Blobel G. (1981)

Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes

J Cell Biol 91, Seiten 557-561.

Weber V., Wernitznig A., Hager G., Harata M., Frank P. & Wintersberger U. (1997)

Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy

Eur J Biochem 249, Seiten 309-317

Webster P.J., Liang L., Berg C.A., Lasko P. & Macdonald P.M. (1997)

Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved

Genes Dev 11, Seiten 2510-2521

Wharton R.P. & Struhl G. (1991)

RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos

Cell 67, Seiten 955-967.

Wickham L., Duchaine T., Luo M., Nabi I.R. & DesGroseillers L. (1999)

Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum

Mol Cell Biol 19, Seiten 2220-2230

Wilhelm J.E., Vale R.D. & Hegde R.S. (2000)

Coordinate control of translation and localization of Vg1 mRNA in *Xenopus* oocytes

Proc Natl Acad Sci U S A 97, Seiten 13132-13137.

Wilusz C.J., Wormington M. & Peltz S.W. (2001)

The cap-to-tail guide to mRNA turnover

Nat Rev Mol Cell Biol 2, Seiten 237-246.

Winston F., Dollard C. & Ricupero-Hovasse S.L. (1995)

Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C

Yeast 11, Seiten 53-55

Wintersberger U., Kuhne C. & Karwan A. (1995)

Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy

Yeast 11, Seiten 929-944

Wong G., Muller O., Clark R., Conroy L., Moran M.F., Polakis P. & McCormick F. (1992)
Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP- associated tyrosine phosphoprotein p62

Cell 69, Seiten 551-558

Wreden C., Verrotti A.C., Schisa J.A., Lieberfarb M.E. & Strickland S. (1997)
Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA

Development 124, Seiten 3015-3023

Wu Y., Muench D.G., Kim Y.T., Hwang Y.S. & Okita T.W. (1998)
Identification of polypeptides associated with an enriched cytoskeleton-protein body fraction from developing rice endosperm

Plant Cell Physiol 39, Seiten 1251-1257.

Yang Y.Y., Yin G.L. & Darnell R.B. (1998)
The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia

Proc Natl Acad Sci U S A 95, Seiten 13254-13259

Zaffran S., Astier M., Gratecos D. & Sémériva M. (1997)
The held out wings (how) Drosophila gene encodes a putative RNA-binding protein involved in the control of muscular and cardiac activity

Dev Suppl 124, Seiten 2087-2098

Zorn A.M. & Krieg P.A. (1997)
The KH domain protein encoded by quaking functions as a dimer and is essential for notochord development in Xenopus embryos

Genes Dev 11, Seiten 2176-2190